

**Zur Hemmung von Trypsin  
durch neue Trypanocide Amidine  
und über die  
Proteinasen von Trypanosoma Rhodesiense**

von  
**Giso Harbaum-Neuhaus**  
aus  
**Friedensdorf**



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

**Zur Hemmung von Trypsin  
durch neue Trypanocide Amidine  
und über die  
Proteinasen von Trypanosoma Rhodesiense**

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt  
von  
**Giso Harbaum-Neuhaus**  
aus  
**Friedensdorf**

Als Dissertation genehmigt von den  
Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität  
Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 1980

Vorsitzender der

Promotionskommission : Professor Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter : Professor Dr. O. Dann

Zweitberichterstatter : Professor Dr. H. Fritz

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1975 bis Februar 1980 im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Angewandte Chemie, der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. O. D a n n , der die Anregung zu dieser Arbeit gab, danke ich sehr herzlich für seine fördernde Unterstützung bei ihrem Fortgang und für das mir stets entgegengebrachte Verständnis.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. H. F r i t z , vom Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München, für die vielseitige theoretische und auch praktische Unterstützung.

Frau H. L ü l l i n g danke ich sehr herzlich für ihre fachkundige Hilfe bei der Bestimmung der Inhibitorkonstanten.

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                       | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Zusammenfassung .....                                                                 | 1     |
| A. <u>T h e o r e t i s c h e r   T e i l</u>                                         | 3     |
| 1.      Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnisse der<br>Untersuchungen .....         | 3     |
| 1.1.    Struktur kationischer trypanocider Verbindungen.                              |       |
| 1.2.    Ausgangspunkt und Zielsetzung .....                                           | 5     |
| 1.3.    Serinproteinasen .....                                                        | 6     |
| 1.3.1.    Synthese und Sekretion von Exportproteinen .....                            | 6     |
| 1.3.2.    Proteinase in der biologischen Regulation .....                             | 7     |
| 1.3.3.    Vorkommen und Funktion von Serinproteinasen und<br>verwandten Enzymen ..... | 8     |
| 1.4.    Natürliche Substrate und Hemmstoffe .....                                     | 12    |
| 1.4.1.    Natürliche Substrate .....                                                  | 12    |
| 1.4.2.    Natürliche Inhibitoren .....                                                | 12    |
| 1.5.    Synthetische Substrate und Inhibitoren .....                                  | 16    |
| 1.5.1.    Synthetische Substrate .....                                                | 16    |
| 1.5.2.    Synthetische Inhibitoren .....                                              | 19    |
| 1.6.    Eigene Messungen .....                                                        | 25    |
| 1.6.1.    Allgemeine Angaben .....                                                    | 25    |
| 1.6.2.    Ergebnisse der Inhibitionsversuche mit Trypsin .                            | 26    |
| 1.6.2.1.    KI-Werte von Typ A <sub>1</sub> .....                                     | 27    |
| 1.6.2.2.    KI-Werte von Typ A <sub>2</sub> .....                                     | 31    |
| 1.6.2.3.    KI-Werte von Typ B .....                                                  | 33    |
| 1.6.2.4.    KI-Werte von Typ C .....                                                  | 36    |
| 1.6.2.5.    KI-Werte von Typ D .....                                                  | 39    |
| 1.6.2.6.    KI-Werte von Typ E .....                                                  | 42    |
| 1.6.2.7.    KI-Werte von Typ F .....                                                  | 44    |
| 1.6.3.    Diskussion der Ergebnisse .....                                             | 46    |
| 1.6.3.1.    Variation der kationischen Flanken .....                                  | 46    |

|           |                                                                                                              |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6.3.2.  | Einfluß der Substituentenstellung .....                                                                      | 47 |
| 1.6.3.3.  | Bevorzugtes Ringsystem für die Bindungstasche .....                                                          | 48 |
| 1.6.3.4.  | Typ A <sub>1</sub> .....                                                                                     | 49 |
| 1.6.3.5.  | Typ A <sub>2</sub> .....                                                                                     | 49 |
| 1.6.3.6.  | Typ B .....                                                                                                  | 50 |
| 1.6.3.7.  | Typ C .....                                                                                                  | 50 |
| 1.6.3.8.  | Typ D .....                                                                                                  | 52 |
| 1.6.3.9.  | Typ E .....                                                                                                  | 53 |
| 1.6.3.10. | Typ F .....                                                                                                  | 54 |
| 1.6.4.    | Zusammenhang zwischen Trypsinhemmung und in vivo-<br>Wirksamkeit gegen Trypanosom rhodesiense .....          | 54 |
| 1.7.      | Angaben zur Bestimmung von Hemmkonstanten .....                                                              | 59 |
| 1.7.1.    | Wahl des Testsystems .....                                                                                   | 59 |
| 1.7.1.1.  | Meßansatz für Trypsininhibitoren .....                                                                       | 59 |
| 1.7.2.    | Reale Hemmkurve von Trypsin .....                                                                            | 61 |
| 1.7.2.1.  | Bestimmung der Inhibitorkonzentration für 30-<br>70 %ige Enzymhemmung und Ermittlung der ID <sub>50</sub> .. | 61 |
| 1.7.3.    | Auswertung der Meßergebnisse .....                                                                           | 63 |
| 1.7.4.    | Linearität im Meßansatz .....                                                                                | 66 |
| 1.7.5.    | Einfluß von Dimethylsulfoxid auf das Meßsystem .....                                                         | 66 |
| 1.7.5.1.  | Beeinflussung der Enzymaktivität .....                                                                       | 66 |
| 1.7.5.2.  | Beeinflussung der Inhibitorkonstante .....                                                                   | 68 |
| 1.7.6.    | Fehler des Meßverfahrens .....                                                                               | 69 |
| 2.        | Nachweis und Charakterisierung enzymatischer<br>Aktivitäten in Trypanosoma brucei, rhodesiense .....         | 70 |
| 2.1.      | Bekannte Enzyme der Gattung Trypanosoma .....                                                                | 70 |
| 2.2.      | Eigene Untersuchungen .....                                                                                  | 71 |
| 2.2.1.    | Enzymatische Aktivität und Hemmbarkeit intakter<br>Trypanosomen .....                                        | 71 |
| 2.2.1.1.  | Aktivität frisch isolierter, intakter Trypano-<br>somen .....                                                | 71 |
| 2.2.1.2.  | Beeinflussung durch Inhibitoren .....                                                                        | 74 |

|          |                                                                                                 |     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.2.   | Enzymatische Aktivität von Trypanosomen Waschwasser .....                                       | 74  |
| 2.2.3.   | Charakterisierung des Trypanosomenrohextrakts ..                                                | 75  |
| 2.2.3.1. | Lysieren der Trypanosomen .....                                                                 | 75  |
| 2.2.3.2. | Einfluß von Natriumazid auf die Enzymaktivität .                                                | 76  |
| 2.2.3.3. | Linearität im Testansatz .....                                                                  | 76  |
| 2.2.3.4. | Stabilität des Rohextrakts .....                                                                | 78  |
| 2.2.3.5. | Spaltungsspezifität gegenüber verschiedenen Substraten .....                                    | 78  |
| 2.2.3.6. | Einfluß zweiwertiger Kationen und Kaliumcyanid auf die Aktivität des Rohextrakts .....          | 79  |
| 2.2.3.7. | Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die Aktivität des Rohextrakts .....                   | 80  |
| 2.2.3.8. | Spaltung von p-Guanidinobenzoessäure-4'-nitrophenylester .....                                  | 82  |
| 2.2.3.9. | PH- und Temperatur-Maxima unterschiedlicher Substratspaltungen durch Trypanosomenrohextrakt ... | 83  |
| 2.2.4.   | Reinigung des Trypanosomenrohextrakts durch Affinitätschromatographie .....                     | 86  |
| 2.2.4.1. | Reinigung des Rohextrakts aus Trypanosom rhodesiense .....                                      | 90  |
| 2.2.5.   | Diskussion der Ergebnisse .....                                                                 |     |
| B.       | <u>E x p e r i m e n t e l l e r   T e i l</u>                                                  | 100 |
| 3.       | Allgemeine Angaben über Materialien und Geräte .                                                | 100 |
| 3.1.     | Verwendete Geräte .....                                                                         | 100 |
| 3.2.     | Verwendete spezielle Substanzen .....                                                           | 101 |
| 3.3.     | Spezielle Puffer .....                                                                          | 102 |
| 4.       | Arbeitsvorschriften .....                                                                       | 103 |
| 4.1.     | Meßverfahren für Trypsininhibitoren .....                                                       | 103 |
| 4.1.1.   | Herstellung der Lösungen .....                                                                  | 103 |
| 4.1.2.   | Auswertung der Meßergebnisse .....                                                              | 104 |

|           |                                                                                                 |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.      | Arbeitsvorschriften zu Versuchen mit Trypanoso-<br>men und Trypanosomenrohextrakt .....         | 105 |
| 4.2.1.    | Aufzucht von Trypanosomen .....                                                                 | 105 |
| 4.2.2.    | Säulenchromatographische Reinigung der Trypa-<br>nosomen von Blutbestandteilen .....            | 106 |
| 4.2.2.1.  | Chromatographieanordnung .....                                                                  | 106 |
| 4.2.2.2.  | Durchführung der Chromatographie .....                                                          | 106 |
| 4.2.3.    | Sicherheitsvorkehrungen zur Vermeidung von<br>Selbstinfektion .....                             | 107 |
| 4.2.4.    | Enzymatische Aktivität intakter Trypanosomen ....                                               | 108 |
| 4.2.4.1.  | L-Bapa-Testansatz .....                                                                         | 108 |
| 4.2.4.2.  | Testansatz mit K a b i - Substraten .....                                                       | 109 |
| 4.2.4.2.1 | Allgemeine Angaben .....                                                                        | 109 |
| 4.2.4.2.2 | Inkubation in Zentrifugenröhrchen .....                                                         | 110 |
| 4.2.4.2.3 | Inkubation in Meßküvetten .....                                                                 | 110 |
| 4.2.4.3.  | Hemmansatz mit Substrat S-2251 .....                                                            | 110 |
| 4.2.4.4.  | Testansatz mit Azocasein als Substrat .....                                                     | 111 |
| 4.2.5.    | Enzymatische Aktivität in Trypanosomenrohextrakt                                                | 112 |
| 4.2.5.1.  | Lagerung der Trypanosomen .....                                                                 | 112 |
| 4.2.5.2.  | Aufschluß der Trypanosomen .....                                                                | 112 |
| 4.2.5.3.  | L-Bapa-Testansatz für Trypanosomenrohextrakt und<br>gereinigte Proben .....                     | 113 |
| 4.2.5.4.  | L-BAEE-Testansatz für Trypanosomenrohextrakt ....                                               | 114 |
| 4.2.5.5.  | Testansatz mit K a b i - Substraten für Trypa-<br>nosomenrohextrakt und gereinigte Proben ..... | 114 |
| 4.2.5.6.  | Plasminogenaktivierung im Rohextrakt durch<br>Stroptokinase .....                               | 115 |
| 4.2.5.7.  | Kombinierter Aktivitäts- und Hemm-Ansatz mit<br>K a b i - Substraten .....                      | 116 |
| 4.2.5.8.  | Azocaseintest .....                                                                             | 116 |
| 4.2.6.    | Einfluß zweiwertiger Kationen und Kaliumcyanid<br>auf unterschiedliche Testsysteme .....        | 117 |
| 4.2.6.1.  | Stammlösungen .....                                                                             | 117 |
| 4.2.6.2.  | L-Bapa-Test .....                                                                               | 118 |
| 4.2.6.3.  | Azocaseintest .....                                                                             | 118 |

|           |                                                                                                                                                      |     |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.6.4.  | Test mit K a b i - Substraten .....                                                                                                                  | 119 |
| 4.2.7.    | Einfluß einiger Inhibitoren auf unterschiedliche Aktivitäten des Rohextrakts .....                                                                   | 119 |
| 4.2.7.1.  | Stammlösungen .....                                                                                                                                  | 119 |
| 4.2.7.2.  | Hemmung im Azocaseintest .....                                                                                                                       | 120 |
| 4.2.7.3.  | Hemmung der Azocaseinspaltung durch unterschiedliche Konzentrationen des Sojabohnentrypsininhibitors, Trasylols <sup>R</sup> , 150/49 und DAPI ..... | 121 |
| 4.2.7.4.  | Hemmansatz mit K a b i - Substraten .....                                                                                                            | 121 |
| 4.2.7.5.  | Hemmansatz mit L-Bapa .....                                                                                                                          | 122 |
| 4.2.8.    | Spaltung von p-Guanidinobenzoessäure-4'-nitrophenylester durch Rohextrakt .....                                                                      | 122 |
| 4.2.9.    | Temperaturoptima mit K a b i - Substraten .....                                                                                                      | 123 |
| 4.2.10.   | PH-Optima des Rohextrakts bei verschiedenen Substraten .....                                                                                         | 123 |
| 4.2.10.1. | L-Bapa .....                                                                                                                                         | 123 |
| 4.2.10.2. | K a b i - Substrate ohne Inhibitorzusatz .....                                                                                                       | 124 |
| 4.2.10.3. | K a b i - Substrate mit Inhibitorzusatz .....                                                                                                        | 124 |
| 4.2.10.4. | Azocasein .....                                                                                                                                      | 124 |
| 4.2.11.   | Einfluß von Natriumazid auf die L-Bapa-Spaltung .....                                                                                                | 125 |
| 4.2.12.   | Stabilität des Rohextrakts im L-Bapa-Test .....                                                                                                      | 125 |
| 4.2.13.   | Kupplung von kationischen Liganden an CH-Sepharose 4-B.....                                                                                          | 125 |
| 4.2.13.1. | Kupplung von p-Aminobenzamidin Hydrochlorid ....                                                                                                     | 125 |
| 4.2.13.2. | Kupplung von 2-(4-Aminophenyl)imidazolin-2-yl Hydrochlorid .....                                                                                     | 126 |
| 4.2.13.3. | Kupplung von 6-Amidino-2-(4-aminophenyl)indol Dihydrochlorid .....                                                                                   | 126 |
| 4.2.13.4. | Kupplung von 2-(4-Aminophenyl)-6-(2-imidazolin-2-yl) indol Dihydrochlorid .....                                                                      | 127 |
| 4.2.13.5. | Kupplung von 6-Amidino-2-[4(aminophenoxy)phenyl] indol Dihydrochlorid .....                                                                          | 127 |
| 4.2.13.6. | Kupplung von 2-[4(4-Aminophenoxy)phenyl] -6-(2-imidazolin-2-yl) indol Dihydrochlorid .....                                                           | 127 |
| 4.2.14.   | Chromatographieversuche mit DNA und Trypsin ....                                                                                                     | 128 |

|           |                                                                                        |     |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.14.1. | Verträglichkeit des Testmaterials mit unterschiedlichen Puffern und Ionenstärken ..... | 128 |
| 4.2.14.2. | Verträglichkeiten des Testmaterials mit Affinitätsgelelen .....                        | 128 |
| 4.2.14.3. | Chromatographieanordnung .....                                                         | 129 |
| 4.2.14.4. | Durchführung der Affinitätschromatographie ....                                        | 130 |
| 4.2.14.5. | Chromatographie von Trypsin und DNA .....                                              | 130 |
| 4.2.15.   | Reinigung des Trypanosomenrohextrakts durch Gelchromatographie .....                   | 133 |
| 4.2.15.1. | Gelchromatographie mit Sephadex G-100 .....                                            | 133 |
| 4.2.15.2. | Hemmung durch unterschiedliche Inhibitoren ....                                        | 134 |
| 4.2.16.   | Reinigung des Trypanosomenrohextrakts durch Affinitätschromatographie .....            | 135 |
| 4.2.16.1. | Chromatographie mit Imidazolinbenzsepharose ...                                        | 135 |
| 4.2.16.2. | Gelchromatographie mit Sephadex G-200 .....                                            | 136 |
| 4.2.16.3. | Chromatographie mit Amidinoindolsepharose ....                                         | 136 |
| 4.2.16.4. | Hemmung durch DAPI, STI, Trasylol <sup>R</sup> mit Substrat S-2266 .....               | 138 |
| 4.2.16.5. | Hemmung durch steigende Antipain-Konzentrationen .....                                 | 138 |
| 4.2.16.6. | Gelchromatographie mit Sephadex G-75 .....                                             | 138 |
| 4.2.17.   | Anreicherung .....                                                                     | 140 |
| 4.2.18.   | Dialyse .....                                                                          | 140 |
| 4.2.19.   | Proteinbestimmung .....                                                                | 141 |
|           | Literaturverzeichnis .....                                                             | 142 |
|           | Lebenslauf .....                                                                       | 151 |



## Z u s a m m e n f a s s u n g

Die gut trypanociden Diamidine 102/198, 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)-indol (Nr. 23) 98/202, 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)-thionaphten (Nr. 20) und 150/49, 5-Amidino-2-(4-amidonophenyl)-benzofuran (Nr. 24) sind ebenfalls gute Proteinasehemmstoffe mit KI-Werten gegenüber Trypsin von 4,9  $\mu\text{M}$ , 2,0  $\mu\text{M}$  und 5,8  $\mu\text{M}$ .

Durch folgende systematische Variationen hat sich die Hemmwirkung um mehr als das Zehnfache verbessern lassen. Als Brückenglied zwischen dem Benzolheterofünfringsystem und dem Phenylring oder einem zweiten Benzolheterofünfring eignen sich besonders die aliphatischen:  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$  (Nr. 143, 176),  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$  (Nr. 147),  $-(\text{CH}=\text{CH})_2-$  (Nr. 186) und  $-(\text{CH}_2)_4-$  (Nr. 149, 187) Brücken. Ferner eignen sich, allerdings nur zwischen Benzolheterofünfring und Phenylring, die aromatischen Brücken:  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-$  (Nr. 198),  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-$  (Nr. 199) oder  $-(3)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-$  (Nr. 194), wohingegen die Verknüpfung von zwei Benzolheterofünfringen ohne Brücke (Nr. 129) oder mit kurzen aliphatischen Brücken:  $-\text{CH}_2-$  (Nr. 17),  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (Nr. 156, 161) und  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (Nr. 19, 131) schon sehr gute Hemmwerte liefert. Daß eine gute Hemmwirkung nicht an eine zweite Amidogruppe im Phenylring gebunden ist, zeigt Nr. 54.

Eine direkte Korrelation zwischen Trypsinhemmung und in-vivo-Wirksamkeit gegen *T. rhodesiense* ergibt sich nicht, da nicht alle guten Inhibitoren trypanocid wirken; jedoch hat keines der gut trypanociden Diamidine eine schlechte Hemmkonstante.

Bei intakten *Trypanosoma rhodesiense* kann eine komplexe Proteinaseaktivität nachgewiesen werden, die durch eine 0,1 mM DAPI-Konzentration nur zu etwa 50 % gehemmt wird. Die Spaltungsaktivität von  $10^{10}$  intakten Trypanosomen, das sind etwa 1 Gramm Trypanosomen, erhöht sich durch lysieren mit mehrmaligem Einfrieren und Auftauen um das Zehnfache von 0,16 U/g auf 1,6 U/g im L-Bapa-Test. Das natürliche Substrat Azocasein wird im Gegensatz zu synthetischen Substraten durch Rohextrakt im sauren Milieu optimal gespalten. Mit den spezifischen Peptidsubstraten der Firma K a b i wird im Verein mit den spe-

zifischen natürlichen Inhibitoren Antipain, Sojabohnentrypsin-inhibitor und Trasylol<sup>R</sup>, das Vorliegen mehrerer Proteinase bewiesen. Während intakte Trypanosomen das Plasminsubstrat S-2251 am besten spalten, werden vom Trypanosomenrohextrakt und gereinigten Proben die beiden Kallikreinsubstrate S-2302 und S-2266 besser gespalten. Durch aufeinanderfolgende Affinitätschromatographie erstens mit Imidazolinbenzsepharose zur Abtrennung hauptsächlich von DNA und zweitens mit Amidinoindolsepharose zur Anreicherung von Proteinase nebst anschließender Sephadex-Gelchromatographie konnte die Enzymaktivität gegenüber L-Bapa 16-fach und gegenüber den K a b i - Substraten 30-fach angereichert werden, verglichen mit dem Rohextrakt. Die Aktivität der angereicherten Probe wird schon von 0,016 mM DAPI zu 55 % gehemmt. Weitere Aktivitäts- und Hemmversuche lassen darauf schließen, daß die Hauptaktivität des Rohextrakts einer Thiolproteinase vom Typ des Kathepsins B oder des Papains zuzuordnen ist.

## A Theoretischer Teil

### 1. Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnisse der Untersuchungen

#### 1.1. Struktur kationischer trypanocider Verbindungen

Die in der Chemotherapie der Trypanosomiasen eingesetzten Medikamente mit kationischer Struktur zeigen eine hohe Affinität zu Nucleinsäuren. Daneben werden sie auch von anderen anionischen Zellbestandteilen, Proteinen, Phospholipiden und den sauren Lipoproteinmembranen der Lysosomen gebunden <sup>1)</sup>. Der Kinetoplast der Trypanosomen mit seiner spezifischen DNA gilt als Hauptangriffspunkt dieser Substanzen <sup>1)</sup>, die offenbar gut dessen Membran durchdringen <sup>2)</sup> und sich hier anreichern.

Die DNA des Kinetoplasten unterscheidet sich in folgenden vier Kriterien von der DNA des Zellkerns:

- 1) Als mitochondriale DNA hat sie einen großen Anteil an zirkulären Molekülen <sup>3)</sup>.
- 2) In der Basenzusammensetzung weist sie einen erhöhten Anteil an Adenosin-Thymin-Basenpaaren auf <sup>4)</sup>.
- 3) Sie ist nicht von einer Histonhülle umgeben <sup>5)</sup>.
- 4) Sie zeigt eine andere Enzymspezifität bei der DNA-Replikation <sup>6)</sup>.

Durch Anlagerungen an diese DNA verhindern die kationischen Verbindungen die RNA-Synthese, indem sie die Wirkung der Polymerasen hemmen durch Anlagerung an RNA-Primer oder an wachsende Polynucleotidketten <sup>7)</sup>.

Der kationische Arzneistoff bildet dabei einen festen aber nicht kovalenten Komplex mit der DNA, wobei es zu einer Außenanlagerung und einer Interkalation kommen kann <sup>8)</sup>.

G e r a t z <sup>9) 10)</sup> zeigte, daß ein bestimmter Substanztyp, bei dem die kationischen Ladungen in Form einer Amidgruppe vorliegen, gute Hemmeigenschaften gegenüber den Serinproteinasen Trypsin <sup>10)</sup>, Kallikrein <sup>11)</sup>, Thrombin <sup>12)</sup>, Plasmin und Plasminogenaktivator <sup>13)</sup> entfaltet.



F r i t z hat aus Spermien die Proteinase Akrosin isoliert <sup>14)</sup> und es ist bekannt, daß das in der Akrosomenkappe lokalisierte trypsinähnliche <sup>15)</sup> Enzym die Penetration des Spermatozoen in das Ei und damit die Befruchtung ermöglicht, die durch Akrosin-inhibitoren verhindert werden kann <sup>16)17)18)</sup>. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Akrosin aus Eberspermien auch durch trypanocide <sup>19)</sup> oder andere <sup>20)21)</sup> Amidine gehemmt wird.

Anhand dieser Befunde lassen sich die kationischen trypanociden Substanzen in zwei Gruppen aufteilen (Formelübersicht 1):

- 1) Verbindungen, deren Wirkung auf einer DNA-Anlagerung beruht.
- 2) Verbindungen, die eine DNA-Anlagerung zeigen und zusätzlich Hemmstoffe gegenüber Serinproteinasen darstellen.

Zur ersten Gruppe gehören die bekannten Medikamente Trypaflavin (III), Antrycide (II) und Ethidium (I).

Zur zweiten Gruppe gehören Stilbamidin <sup>R</sup> (1), Hydroxystilbamidin <sup>R</sup> (2), Berenil <sup>R</sup> (3) und Pentamidin <sup>R</sup> (4).

## 1.2. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit

Anknüpfend an die Beobachtung von G e r a t z <sup>9)</sup> konnte bestätigt werden, daß die von D a n n und Mitarbeitern synthetisierten trypanociden Amidine ebenfalls ausgezeichnete Hemmstoffe gegen Serinproteinasen sind <sup>22)</sup>.

Dabei ergab sich eine gewisse Parallelität zwischen den Anti-trypsinaktivitäten und der Wirksamkeit gegen den menschenpathogenen Erreger Trypanosoma rhodesiense. Dieser Parasit vermehrt sich extrazellulär in den Blutgefäßen und befällt später die Lymphgefäße, den Liquor cerebrospinalis und schließlich die Intrazellulärräume des Zentralnervensystems <sup>23)</sup>.

Im Hinblick auf die Ergebnisse von F r i t z ergab sich die Frage, ob auch Trypanosomen für die Passage von Membranen eine serinähnliche Proteinase besitzen.

Würde ein solches Enzym durch trypanocide Amidine gehemmt, so wäre dies ein zweiter möglicher Wirkungsmechanismus derartiger

Wirkstoffe. Substanzen, welche sowohl die Strukturmerkmale für eine gute DNA-Anlagerung besitzen, als auch gute Hemmstoffe von Serinproteinasen sind, sollten dann eine kombinierte, starke trypanocide Wirkung entfalten.

Das Ziel meiner Arbeit war es, anhand von Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen Hemmstoff und Trypsin auf die Struktur optimal wirksamer Verbindungen zu schließen.

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob Trypanosoma rhodesiense eine trypsinähnliche Proteinase intrazellulär enthält und sezerniert, oder extrazellulär auf der Oberfläche gebunden hat und dieses Enzym durch trypanocide Amidine gehemmt wird.

### 1.3. Serinproteinasen

#### 1.3.1. Synthese und Sekretion von "Exportproteinen"

Die Bildung und Sekretion von Enzymen ist besonders gut an den Zellen des exokrinen Pankreas untersucht worden, in denen die enzymatisch inaktiven Zymogene der Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin und Phospholipase in großen Mengen gebildet und in den Dünndarm sezerniert werden.

In Zusammenfassung neuerer Ergebnisse wird folgender Weg der Biosynthese und Sezernierung von "Exportproteinen" postuliert <sup>24)</sup>: Die Proteinsynthese des Präproenzym beginnt an den freien Ribosomen des Cytoplasmas. Das vordere Ende der wachsenden Polypeptidkette fungiert als "Signal-Peptid". Wenn dieses Peptid mit 40 bis maximal 100 Aminosäureresten aus dem Ribosom herausragt, haftet es sich an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) an und bindet das freie Ribosom fest an die Membran des ER. Mit diesem Kontakt entsteht ein Kanal, durch welches das Protein in den Innenraum des ER wächst. Bei diesem Prozeß spaltet sich die Prä-Kette ab. Alle bekannten Prä-Ketten haben als einzige Gemeinsamkeit einen endständigen Methioninrest und einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren. Sie besitzen wahrscheinlich keine Artspezifität.

Ist die Polypeptidkette im Innenraum des ER aufgenommen, dissoziiert das Ribosom wieder ab und steht für die Proteinsynthese neu zur Verfügung. Innerhalb des ER bildet sich die Tertiärstruktur des Zymogens, es werden Disulfidbrücken ausgebildet und Zuckerreste angehängt. Vom ER wandert der Inhalt zum Golgi-Komplex, wo er in Granula verpackt und gespeichert wird. Durch hormonellen Einfluß können die Granula dann mit der Zellmembran verschmelzen und den Inhalt in den extrazellulären Raum ergießen. Fehlen solche Speichergranula, so kommt es wie bei der Immunglobulinsynthese <sup>25)</sup> zu einer kontinuierlichen Sezernierung.

Durch in vitro Synthesen mit m-RNA in zur Proteinsynthese befähigten Systemen sind Enzyme isoliert worden, die eine Kette von 15 - 20 Aminosäuren mehr besitzt als das sezernierte Proenzym.

### 1.3.2. Proteinasen in der biologischen Regulation

Die limitierte, spezifische Spaltung von Zymogenen regelt so wichtige Vorgänge wie Aktivierung von Enzymen, Freisetzung von Peptidhormonen, den Ablauf der Blutgerinnung und Befruchtung. Die Aktivierung eines Enzyms geschieht entweder durch eine Umformung oder durch eine Proteolyse. Plasminogen kann auf beiden Wegen aktiviert werden: Durch Anlagerung von Streptokinase formt sich das "plastische" Zymogen so um, daß das katalytische Zentrum zugänglich wird. Ebenso können Aktivatoren wie die Serinproteinase Urokinase das Zymogen proteolytisch zu Plasmin aktivieren.

Da manche Zymogene eine geringe Substratspaltung zeigen, kann der Aktivierungsvorgang oft kinetisch verfolgt werden. Wahrscheinlich ist in einigen Zymogenen die Substratbindungstasche maskiert, das katalytische Zentrum jedoch schon funktionsfähig <sup>26)</sup>.

Das freigesetzte Enzym kann durch Bildung eines Inhibitor-Enzym-Komplexes abgefangen inaktiviert werden und durch eine physiologische Veränderung wieder "kapazitieren" <sup>16)18)</sup>, also wieder aktiviert werden, wodurch es autokatalytisch wei-

terspalten oder andere untergeordnete Zymogene aktivieren kann. Dadurch wird ein Kaskadenmechanismus ausgelöst, wie er bei den Verdauungsenzymen und der Blutgerinnung funktioniert.

### 1.3.3. Vorkommen und Funktion von Serinproteinasen und verwandten Enzymen

Vier der proteolytischen Enzyme der Blutgerinnung sind Serinproteinasen <sup>27)</sup>. S t e n f l o <sup>28)</sup>, M a g n u s s o n <sup>29)</sup> und N e l e s t u e n <sup>30)</sup> haben unabhängig voneinander in Faktor X und Prothrombin  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäuren im äußeren Bezirk gefunden und vermuten diese Aminosäure auch in den Serinproteinasen Faktor VII und IX. In einem Vitamin-K-abhängigen Carboxylierungsschritt werden diese Seitenreste gebildet, um dann je ein Mol Calcium zu binden und den Kontakt zwischen Faktor und Phospholipiden herzustellen.

Die zwei Serinproteinasen Plasmin und Urokinase sind am Fibrinolyse-System beteiligt. Die Azinarzellen des Pankreas produzieren die Vorstufen der Serinproteinasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Das Aktivierungsenzym Enterokinase gehört ebenso in diese Proteinasenklasse, wie das Akrosin aus den Spermatozoen und die Kallikreine aus dem Serum, Urin und der Speicheldrüse.

Alle diese Enzyme sind Endopeptidasen und haben in ihrem aktiven Zentrum einen reaktiven katalytischen Serinrest, der durch Diisopropylfluorophosphat (DIFP) irreversibel verestert wird. Im Vergleich der Aminosäurefrequenz und der Tertiärstruktur ergibt sich für die Pankreasenzyme eine große Homologie. Vier Disulfidbrücken sind ihnen und vielen anderen systemspezifischen Proteinasen gemein. Sie besitzen ein ähnliches Aktivierungspeptid und die endständige Asparaginsäure 196 und damit den entscheidenden Trigger zur Ausbildung der Aktivitätsdomäne. Die Verhältnisse wurden besonders bei Trypsin studiert <sup>31)</sup>.

Vollkommen identisch ist das "Charge-relay-System" der vier Enzyme (Abb.1+2). Durch eine Wechselwirkung mit der Asparaginsäure 102 über das Histidin 57 wird der Sauerstoff des Serin

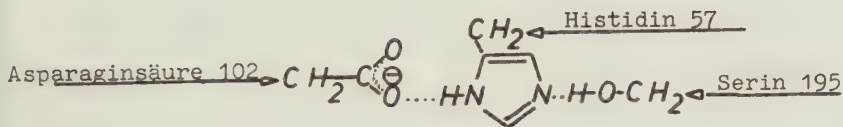
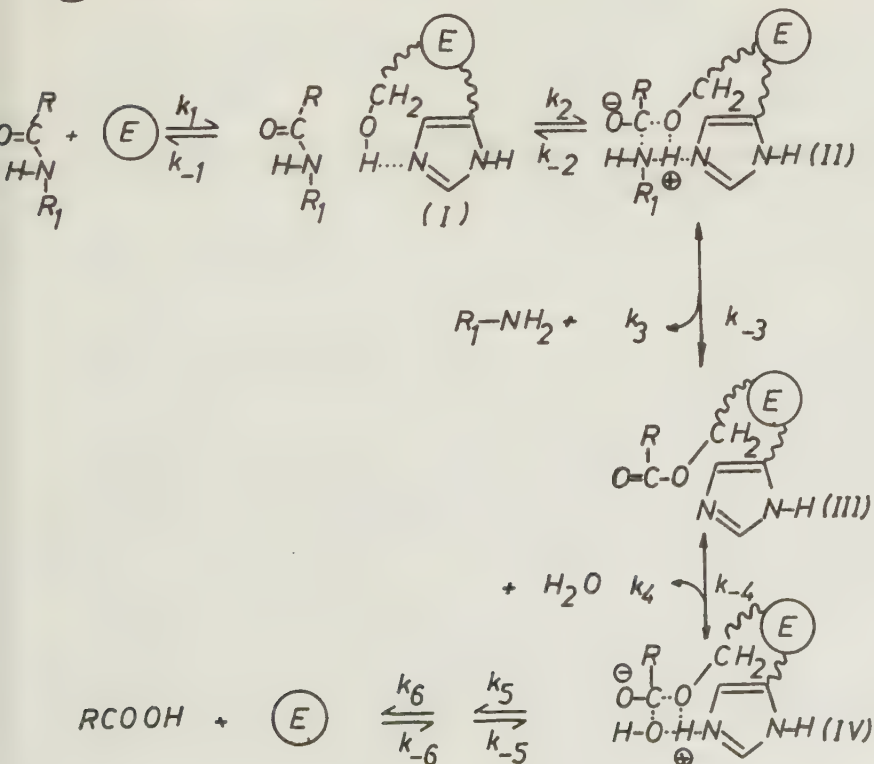


Abbildung 2 Reaktionsschritte der Substratspaltung durch Serinproteinasen <sup>31)</sup>

(E) = Enzymmolekül mit den Seitenketten Serin 195 u. Histidin 57



195 nucleophil und zum proteolytischen Angriff befähigt.

Durch Einlagerung von Substrat wird der von einem Wassermolekül abgeschirmte und sterisch ungünstig stehende Serinsauerstoff zum Histidin gedreht. Durch die Polarisierung oder Protonenverschiebung wird die Gruppe nucleophil und nimmt eine günstigere Stellung zur Carbonylgruppe ein. Der Carbonylsauerstoff wird durch Nachbarkontakte in eine tetraedrische Form gezerzt und durch zwei Wasserstoffbrücken zusätzlich polariert und kann nun in die Esterkonfiguration schwingen (II). Dieser Zustand ist kurzlebig und kann aber nur gelöst werden, wenn gleichzeitig das Proton des Serinsauerstoffs auf das Stickstoffatom der Peptidbindung übertragen wird. Diesen Transport vollführt das Histidin, indem es mit seinem Stickstoff das Proton von Serin übernimmt und durch eine Drehung auf den Säureamidstickstoff überträgt. Dadurch wird das C-terminale Peptidstück entlassen (III).

Die Verseifung des entstandenen Acylenzyms erfolgt durch den Angriff eines Wassermoleküls und führt über die analogen Stufen IV und V zum regenerierten Enzym.

Dieser Mechanismus der Substratspaltung ist wahrscheinlich bei den Serinproteinasen gleich.

Entscheidende Unterschiede ergeben sich dagegen in der Bindungsspezifität gegenüber Substraten und Inhibitoren (s. Abbildung 3) <sup>32)</sup>.

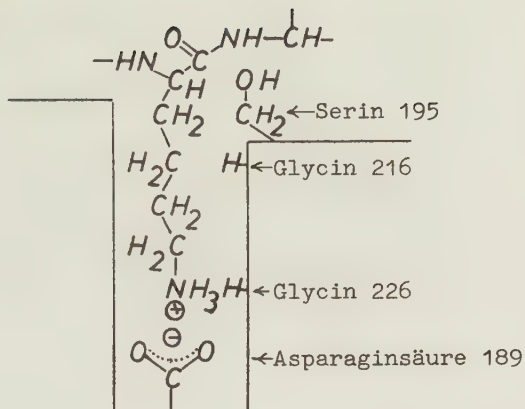
In der Bindungstasche von Trypsin bildet die besondere Asparaginsäure 189 ein Ionenpaar mit der kationischen Endgruppe von Arginin oder Lysin.

Im aktiven Zentrum von Chymotrypsin, wo die Asparaginsäure 189 durch Serin 189 ersetzt ist, werden hauptsächlich aromatische Seitenketten eingelagert. Das Enzym Elastase bindet ausschließlich neutrale Reste.

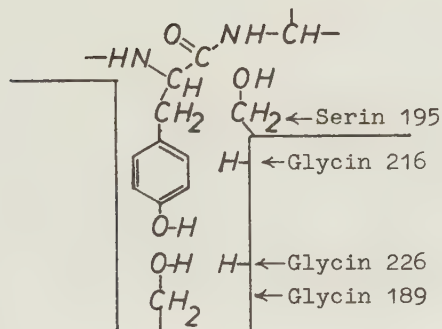
Den Kathepsinen ähnlich ist Papain, eine Thiolproteinase, deren "Charge-relay-System" aus Asparaginsäure 64, Histidin 158 und Cystein 25 besteht <sup>32a)</sup> und in deren Substrattasche bevorzugt eine Arginin-, Lysin- und Glycin-Seitenkette gebunden wird.

Abbildung 3 32)

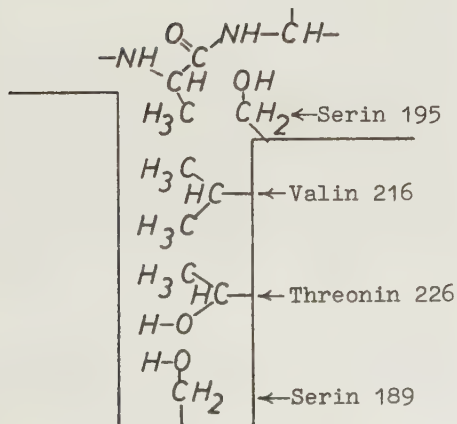
Einlagerung von  
Lysinsubstrat  
bei Trypsin



Einlagerung von  
Tyrosinsubstrat  
bei Chymotrypsin



Einlagerung von  
Alaninsubstrat  
bei Elastase



#### 1.4. Natürliche Substrate und Hemmstoffe <sup>33)</sup>

##### 1.4.1. Natürliche Substrate

Durch eine spezifische Substratspaltung läßt sich ein Enzym charakterisieren und quantitativ bestimmen. Natürliche Substrate haben den Vorteil, die natürliche Endopeptidaseaktivität zu analysieren. Die Kinetik der Substratumsetzung läßt sich jedoch nicht bestimmen, da die abgespalteten Peptide Zwischensubstrate oder Inhibitoren darstellen können. Unreine Enzyme liefern unspezifische Bruchstücke. Die Umsatzrate der natürlichen Substrate ist meist gering und damit die Detektion geringer Enzymaktivitäten erschwert. Die Spaltprodukte von denaturiertem Hämoglobin, Casein, Serumalbumin oder Elastin werden durch UV-Messung, Folin-Lowry oder die Biuret-Methode bestimmt.

Gebräuchliche Substrate sind weiterhin: Azocasein, Fibrinogen, radioaktiv markierte Proteine oder Kininogene.

Ist ein unlösliches Substrat zu einer dünnen Schicht ausgestrichen, lassen sich Enzymaktivitäten gereinigter Proteine oder auch intakter Organismen durch Ausbildung eines proteolytischen Lysehoofs erkennen <sup>34)</sup>.

##### 1.4.2. Natürliche Inhibitoren

Im Kaskadenmechanismus der Blutgerinnung wird der Primäreffekt der Proteolyse um den Faktor  $10^6$  verstärkt. Der Gefahr, die von solchen "Selbstmordenzymen" ausgeht, begegnet der Organismus durch eigene Inhibitoren. Die Wichtigkeit dieser Peptide spiegelt sich in der Tatsache, daß zehn Prozent der Plasmaproteine mit inhibitorischen Eigenschaften ausgestattet sind. Die wichtigsten Inhibitoren sind in Tabelle 1 aufgeführt <sup>35)</sup>.

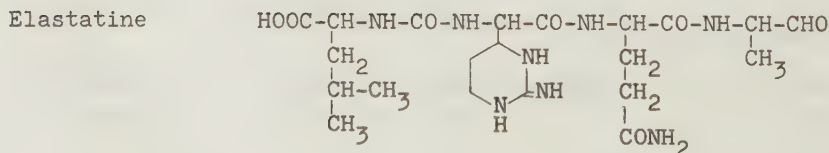
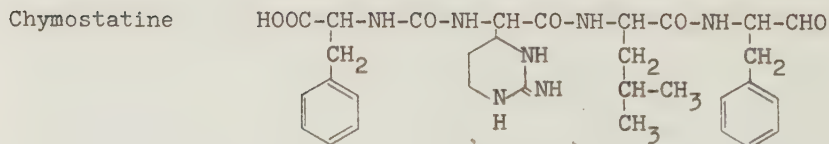
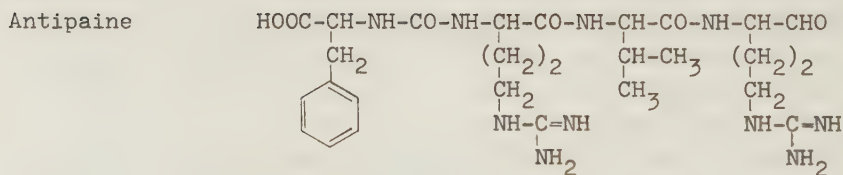
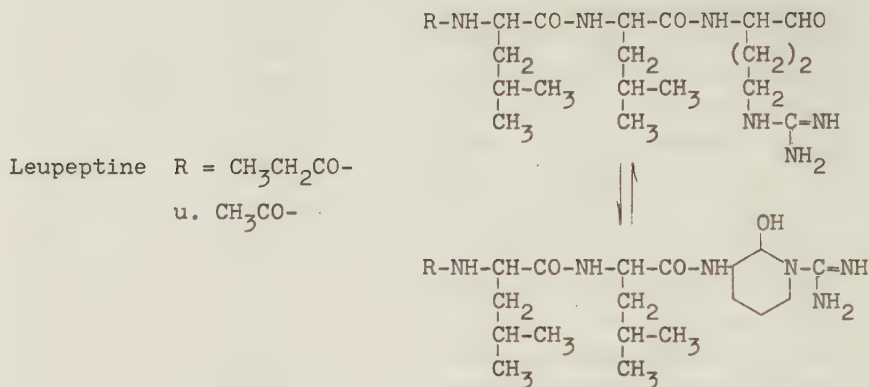
Tabelle 1

| Inhibitor                    | mg in 100 ml<br>Humanserum | MG     | Kohlehydrat-<br>anteil (%) |
|------------------------------|----------------------------|--------|----------------------------|
| $\alpha_1$ -Antitrypsin      | 290                        | 54000  | 12,2                       |
| $\alpha_2$ -Antichymotrypsin | 49                         | 69000  | 24,6                       |
| inter- $\alpha$ -Trypsininh. | 50                         | 160000 | 8,4                        |
| Antithrombin III             | 29                         | 50000  | 13,4                       |
| C <sub>1</sub> -Inaktivator  | 24                         | 104000 | 34,7                       |
| $\alpha_2$ -Makroglobulin    | 260                        | 725000 | 7,7                        |
|                              | <u>702</u>                 |        |                            |

Mit Ausnahme des  $\alpha_2$ -Antichymotrypsininhibitors sind alle Serum-inhibitoren gegen mehrere Proteinasen gerichtet. Inhibitoren, die den Befruchtungsablauf regeln, befinden sich im Seminalplasma <sup>36)</sup> und Cervixsekret <sup>37)</sup>. Inhibitoren vom Kazal-Typ sind aus dem Pankreassekret isoliert worden <sup>38)</sup>. Das Sekret der Nasenschleimhaut und der Bronchien enthält zwei niedermolekulare Inhibitoren mit starker Hemmeigenschaft gegenüber Leukozytenproteinase <sup>39)</sup>. Ein intrazellulär in Rinderorganen gebildeter Inhibitor wurde von K u n i t z <sup>40)</sup> isoliert. Unter dem Handelsnamen Trasylol<sup>R</sup> wird er in der Pankreatitistherapie, bei hämorrhagischen Schockzuständen und hyperfibrinolytischen Blutungen eingesetzt <sup>41)</sup>. Die Wechselwirkung dieses Inhibitors mit Trypsin ist eingehend untersucht worden und erklärt exemplarisch die starke Wirksamkeit solcher Proteine <sup>31)</sup>. An der Bildung des Michaelis-Komplexes, mit einer Dissoziationskonstante von  $2 \times 10^{-13}$  M, sind 14 Aminosäuren des Inhibitors und 58 des Enzyms beteiligt. Dabei passen sich beide Moleküle mit begrenzter Elastizität konformativ aneinander an. Der Übergang in den Acylkomplex (III in Abb. 2) ist außerordentlich erschwert. Durch die hohe Affinität kann Trasylol<sup>R</sup> sogar an Trypsinogen und dessen Substrattasche anlagern.

Eine neue Gruppe niedermolekularer, hochwirksamer Hemmstoffe fand U m e z a w a <sup>42)</sup> in Kulturfiltraten von Actinomyceten.

## Formelübersicht 2

Natürliche, niedermolekulare Hemmstoffe aus Kulturfiltraten  
von Actinomyceten <sup>43)</sup>


Inzwischen sind etwa 40 solcher Peptide bekannt, die gegen Serinproteinasen, Thiolproteinasen, saure Proteasen, Metall-endopeptidasen und Amino-peptidasen aktiv sind. Die wichtigsten Inhibitoren der Serin- und Thiolproteinasen sind in der Formelübersicht 2 aufgeführt. Bisher unbekannte Peptidbindungen mit Harnstoffgruppierungen und seltene Bausteine wie das 2-(2-Iminohexahydro-(4S)-pyrimidyl)-(S)-glycin, ein ringgeschlossenes Arginin, fallen auf. Allen Hemmstoffen ist die essentielle Aldehydgruppe der ersten Aminosäure gemein, deren Oxidation oder Reduktion zum Wirkungsverlust führt. Die Aminosäuren haben alle S- bzw. L-Konfiguration und racemisieren leicht in wässriger Lösung. Die hydrophoben Aminosäuren sind in den einzelnen Inhibitoren gegeneinander ausgetauscht. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht des Hemmverhaltens.

Tabelle 2 <sup>43)</sup> Hemmverhalten natürlicher, niedermolekularer Inhibitoren

| Inhibitor:   | Leupeptine | Antipaine | Chymostatine | Elastatine |
|--------------|------------|-----------|--------------|------------|
| Enzym:       |            |           |              |            |
| Trypsin      | +          | +         |              |            |
| Chymotrypsin | -          | -         | +            |            |
| Papain       | +          | +         | (+)          |            |
| Plasmin      | +          | (+)       |              |            |
| Cathepsin A  |            | +         |              |            |
| Cathepsin B  | +          | +         |              |            |
| Elastase     |            |           |              | +          |

Tabelle 3 Hemmung von Trypsin, Eberakrosin und Kallikreinen durch Leupeptin und Antipain <sup>44)</sup>

| Enzym:  | Trypsin <sup>a</sup> | Eberakrosin <sup>b</sup> | Kallikreine <sup>b</sup> (Schwein) |                      |                      |
|---------|----------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|
|         |                      |                          | Pankreas                           | Gl.submand.          | Urin                 |
| Inhib.: |                      |                          |                                    |                      |                      |
| Leup.   | $4,8 \times 10^{-6}$ | $8,6 \times 10^{-8}$     | $4,1 \times 10^{-6}$               | $1 \times 10^{-5}$   | $1,3 \times 10^{-5}$ |
| Antip.  | $4,3 \times 10^{-7}$ | $7,1 \times 10^{-8}$     | $1,6 \times 10^{-5}$               | $3,9 \times 10^{-5}$ | $9,5 \times 10^{-5}$ |

a  $ID_{50}$  = Inhibitorkonzentration bei 50 %iger Hemmung mit Casein als Substrat <sup>45)</sup>.

b KI-Wert mit BAEE als Substrat.

### 1.5. Synthetische Substrate und Inhibitoren

#### 1.5.1. Synthetische Substrate

Die systematische Einführung synthetischer Substrate bringt viele Vorteile mit sich:

- 1) Hohe Umsatzraten erlauben Aktivitätsbestimmungen von geringen Enzymkonzentrationen;
- 2) durch Abspaltung eines variablen Chromophors läßt sich die Aktivität direkt verfolgen und leicht messen und
- 3) wenn dieser Chromophor kein Inhibitor ist, kann die Kinetik der Reaktion bestimmt werden;
- 4) die Spezifität der Peptidspaltung ist durch reine Substrate gewährleistet;
- 5) die für die Spezifitätstasche der Proteinase "maßgeschneiderten" Substrate lassen sich durch logische Modifikation zu hochwirksamen Inhibitoren umfunktionieren.

Durch derartige reversible oder irreversible Hemmstoffe kann das aktive Zentrum eines Enzyms weiterhin charakterisiert werden. Es ist daher nicht verwunderlich, daß die Entwicklung der Substrate und Inhibitoren eng miteinander verknüpft ist (Formelübersichten 2 und 3). Als einfache Substrate haben sich Ester (BAEE) oder

Amide (L-Bapa) von solchen Aminosäuren bewährt, die komplementär in der Spezifitätstasche des Enzyms gebunden werden. Da die Ester im PH-Optimum der neutralen Proteinasen eine relative Instabilität zeigen, werden sie trotz ihrer größeren Spaltungsrate seltener eingesetzt.

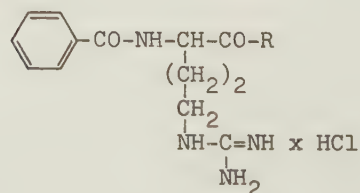
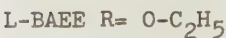
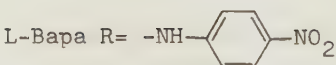
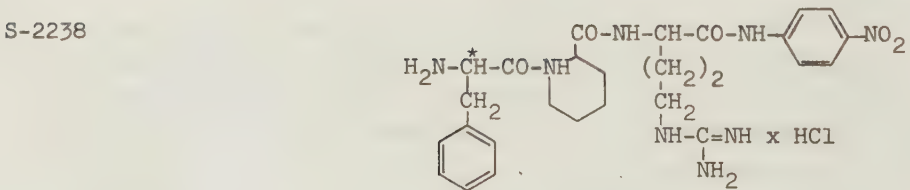
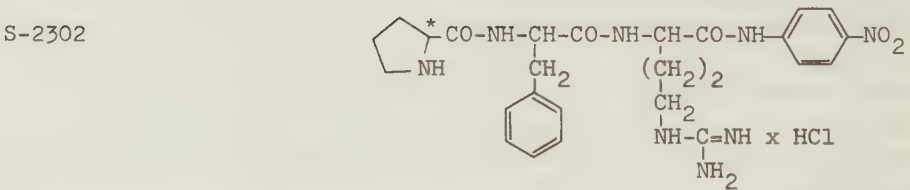
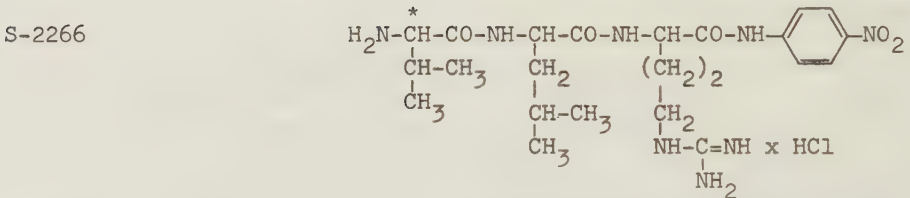
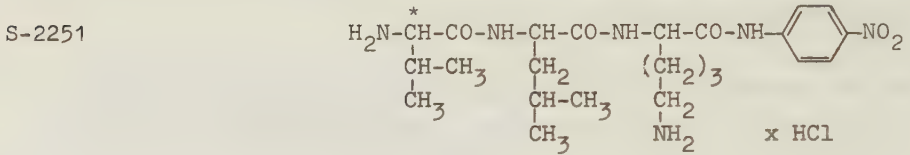
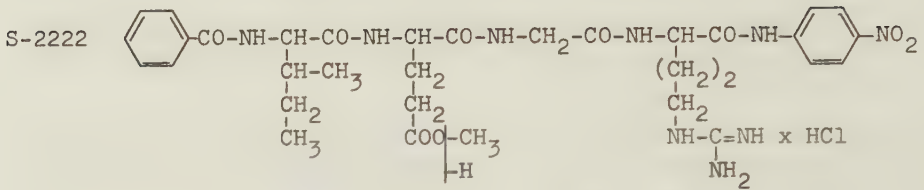
Peptidsubstrate mit etwa fünf Aminosäuren entfalten dank ihrer spezifischeren Anpassung an das Enzym eine größere Aktivität und Spezifität. Man kann sie als Substratanaloga der niedermolekularen natürlichen Inhibitoren bezeichnen.

Im Gegensatz zu den einfachen Substraten mit einer Aminosäure, treten neben der Primärbindungsstelle ( $P_1$ ) weitere Aminosäuren ( $P_2$ - $P_9$ ) durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit der antiparallelen Enzympositionen ( $S_2$ - $S_9$ ) in Wechselwirkung und bilden den Michaeliskomplex <sup>46)</sup>.

Drei solcher Bindungsstellen sind beim Chymotrypsin, zwei beim Trypsin und fünf bis sechs bei der unspezifischen Endopeptidase Subtilisin an der Substratanlagerung beteiligt. Der Austausch einer Aminosäure oder die Verschiebung in eine andere Position kann die Spezifität eines solchen Peptidsubstrats stark verändern bis hin zu einer Hemmeigenschaft. Durch den Ersatz der endständigen N-benzoylierten L-Aminosäure gegen eine ungeschützte D-Aminosäure ergibt sich einerseits eine höhere Affinität und andererseits eine bessere Wasserlöslichkeit. Darüber hinaus werden solche Peptide nicht durch die Aminopeptidasen des Plasmas gespalten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Substrate der Firma K a b i (s. Formelübersicht 3) werden von reinen Enzymen relativ spezifisch gespalten. Die Spaltungsraten ( $\Delta E/Min$ ) bei  $4 \times 10^{-9}$  molarer Enzymkonzentration sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

## Formelübersicht 3

Synthetische Substrate

\* D-Aminosäure; alle übrigen Aminosäuren liegen in der L-Form vor.

Tabelle 4 <sup>46)</sup> Relative Empfindlichkeit der K a b i - Substrate gegenüber reinen Enzymen bei  $4 \times 10^{-9}$  M in  $\Delta E/\text{Min.}$

| Enzym:    | Trypsin     | Faktor. Xa | Plasmin | Drüsen- | Plasma- | Thrombin. |
|-----------|-------------|------------|---------|---------|---------|-----------|
| Substrat: | -kallikrein |            |         |         |         |           |
| S-2222    | 0,730       | 0,200      | 0,006   | 0,003   | 0,005   | 0,005     |
| S-2251    | 0,030       | 0,001      | 0,040   | 0,020   | 0,007   | 0,002     |
| S-2266    | 0,110       | 0,001      | 0,002   | 0,130   | 0,006   | 0,005     |
| S-2302    | 0,070       | 0,040      | 0,040   | 0,100   | 0,190   | 0,030     |
| S-2238    | 0,270       | 0,008      | 0,002   | 0,007   | 0,004   | 0,480     |

#### 1.5.2. Synthetische Inhibitoren

Die Klasse der synthetischen Hemmstoffe teilt sich in zwei Hauptgruppen <sup>12)</sup>: Die irreversiblen und die reversiblen Inhibitoren.

- A) Irreversible Inhibitoren gehen mit dem Enzym eine kovalente Bindung ein und ändern die Eigenschaft des Proteins. Sie können entweder unspezifische Strukturen der Peptidkette modifizieren oder selektiv das katalytische Zentrum blockieren. Zur ersten Gruppe gehören die "non active-site-directed inhibitors"; das sind Reagenzien, die Tyrosinreste nitrieren, Disulfidbrücken reduzieren oder Lysinreste acylieren. Die "active-site-directed-inhibitors" (Formelübersicht 4) blockieren das katalytische Zentrum an einer einzigen Aminosäure. Nicht selektive Substanzen wie Diisopropylfluorophosphat (DIFP) oder Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) verestern den katalytischen Serinrest aller Serinproteinasen.

Selektive Inhibitoren binden in der Spezifitätsdomäne und deaktivieren im katalytischen Zentrum.

Die von S h a w <sup>47) 48)</sup> eingeführten Inhibitoren TPCK und TLCK sind Chloromethylketone der N-tosylierten Aminosäuren Phenylalanin und Lysin. Nach spezifischer Einlagerung in der

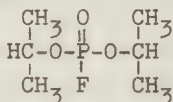
Substrattasche alkyliert die Chlormethylgruppe das Histidin 57 des aktiven Zentrums von Serinproteinasen aber auch die aktive Mercaptogruppe von Thiolproteinasen.

Ähnlich wie TLCK werden die Guanidinobenzoessäureester fixiert; durch Spaltung der Estergruppe acylieren sie den Serinrest 195. S h a w <sup>49)</sup> <sup>50)</sup> hat diese Verbindungen zum Charakterisieren von Enzymen eingesetzt.

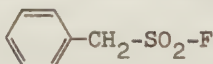
Das aktive Zentrum der Serinproteinasen Trypsin, Thrombin, Plasmin, Kallikrein und Akrosin lassen sich quantitativ mit p-Guanidinobenzoessäure-4-Nitrophenylester titrieren. Das bei der Serin-Acylierung freigesetzte p-Nitrophenol läßt sich photometrisch bestimmen <sup>50)</sup> (Tabelle 5, Nr. 6 und 7).

#### Formelübersicht 4

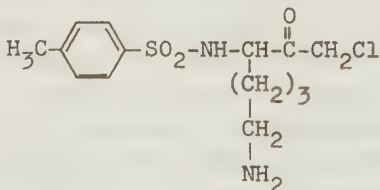
#### Nichtselektive und selektive irreversible Inhibitoren



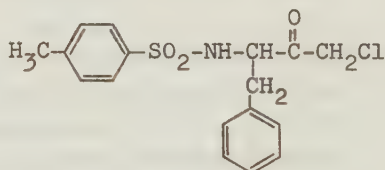
Diisopropylfluorphosphat (DIFP)



Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)



N $\alpha$ -Tosyl-L-lysylchloromethanhydrochlorid (TLCK)



N-Tosyl-L-phenylalanylchloromethan (TPCK)

## B) Reversible Inhibitoren

Reversible Inhibitoren verändern das Enzym nicht, sondern sind in der Regel substratähnliche Verbindungen, die mit dem Substrat um die Enzymbindungsstelle konkurrieren. Die meisten Substanzen sind als kompetitive Inhibitoren zu bezeichnen, da ihre Wirkung durch erhöhte Substratkonzentrationen abgeschwächt wird.

Systematisch variierte aromatische Serinproteinasenhemmstoffe testete M a r k w a r d t <sup>51-56)</sup> bei Trypsin, Plasmin und Thrombin (Tabelle 5, lfd. Nr. 8 u. ff.).

Besonders starke Hemmstoffe sind: 4-Guanidinbenzoesäure-4'-Nitrobenzylester (7), 4-Amidinophenylbrenztraubensäure (8),  $\alpha, \alpha'$ -bis-(4-Amidinobenzyl)cyclopentanon (9), 4-Amidinophenoxyessigsäurebenzylester (10) und das 1- $\beta$ -Naphthyl-3-(6-Amidinonaphthyl-(2))-propanon-(11).

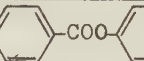
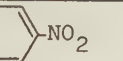
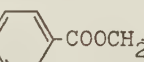
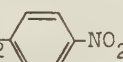
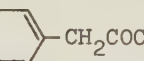
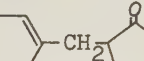
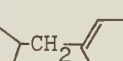
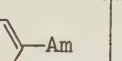
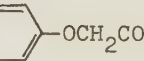
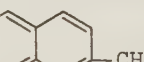
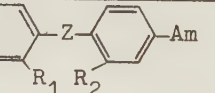
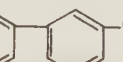
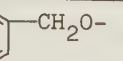
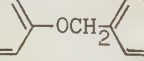
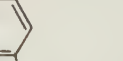
Mit vitro- und vivo-Versuchen prüften G e r a t z et al. den Einfluß von Hemmstoffen mit mehreren Amidingruppen auf die Blutgerinnung und die Kininfreisetzung <sup>11)</sup>.

Er konnte zeigen, daß Amidine, die Plasmin, Thrombin und Faktor Xa in vitro hemmen, in biologischen Testsystemen die Blutblättchen-Agglutination und -Aggregation <sup>57)</sup>, die Komplementaktivierung <sup>58)</sup>, die thrombininduzierte Gerinnung und die "Partial Thromboplastin Time" (PTT) spezifisch verlängern.

Die Variation des Pentamidinmoleküls führten zu einer Reihe hochwirksamer Verbindungen (Nr. 12-15 in Tabelle 5). Weitere serinproteinasenhemmende Diamidine sind in Tabelle 6 aufgeführt <sup>22)</sup>.

Eine hervorragende Wirksamkeit hat das in 2-Stellung über eine Methylenbrücke verdoppelte 5-Amidinobenzimidazol (17). Es war daher keine Überraschung, daß die von D a n n synthetisierten trypanociden Amidine in allen Hemmtesten eine gute und teilweise spezifische Wirksamkeit zeigten (Nr. 18-22). Besonders hervorzuheben ist die Trypsinspezifität von 21 und die gute Antikallikreinwirkung von 20. Während 20 noch in  $10^{-6}$  molarer Konzentration die ADP-induzierte Blut-

Tabelle 5 Hemmkonstanten bedeutender synthetischer Inhibitoren gegenüber Trypsin, Plasmin, Thrombin und Akro-  
sin

| Nr.   | S t r u k t u r                                                                                                                                                                                                                                                                                 | K <sub>I</sub> <sup>a</sup> -Werte (μM) |                |         |      |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------|---------|------|
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Tryps.                                  | Plasm.         | Thromb. | Ref. |
| 6     | Gua-  -COO-                                                                                                                   | 0,04                                    | 0,02           |         | 51)  |
| 7     | Gua-  -COOCH <sub>2</sub> -                                                                                                   | 0,33                                    |                |         | 52)  |
| 8     | Am-  -CH <sub>2</sub> COCOOH                                                                                                                                                                                   | 6,0                                     | 40             | 20      | 53)  |
| 9     | Am-  -CH <sub>2</sub> -  -CH <sub>2</sub> -  | 0,3                                     | 9,5            | 4,6     | 55)  |
| 10    | Am-  -OCH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub>                                                                                                                                                                      | 0,8                                     | 4,0            | 30      | 54)  |
| 11    | Am-  -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-β-Naphthyl                                                                                                                                                            | 0,9                                     | 2,1            | 15      | 56)  |
| 12-15 | Am-                                                                                                                                                                                                            |                                         |                |         |      |
|       | R <sub>1</sub>   R <sub>2</sub>   Z                                                                                                                                                                                                                                                             |                                         |                |         |      |
| 12    | J   J   -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,3                                     | 0,5            | 3,3     | 59)  |
| 13    | Br   H   -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -                                                                                                                                                                                                                                                    | 0,07                                    | 12             | 6,0     | 60)  |
| 14    | Br   Br   -OCH <sub>2</sub> -  -CH <sub>2</sub> O-                                                                                                                                                           | 0,3                                     | 2,2            | 0,3     | 58)  |
| 15    | J   J   -OCH <sub>2</sub> -  -CH <sub>2</sub> O-                                                                                                                                                             | 0,7                                     | 0,03           | 1,2     | 58)  |
| 16    | Am-  -OCH <sub>2</sub> -                                                                                                  | 0,05                                    | (Akro-<br>sin) |         | 20)  |

a) K<sub>I</sub> = Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes.

Tabelle 6    Hemmeigenschaften einiger Diamidine gegenüber  
verschiedenen Serinproteinasen

Nr.                      S t r u k t u r                      Hemmkonstante ( $\mu\text{M}$ )    Code-Nr.    Ref.

|                 |  | Trypsin | Thrombin | Kallikrein | <sup>c</sup><br>Akrosin | <sup>a</sup><br>PTT |         |                       |
|-----------------|--|---------|----------|------------|-------------------------|---------------------|---------|-----------------------|
| 17 <sup>d</sup> |  | 0,2     | 4,2      | 17,3       |                         | 107                 | 41347   | 22                    |
| 18              |  | 2,2     | 4,2      | 9,5        | 0,8                     | 263                 | 150/230 | 22<br>63 <sup>b</sup> |
| 19              |  | 2,2     | 5,8      | 6,6        |                         | 143                 | 253/147 | 61<br>64 <sup>b</sup> |
| 20              |  | 3,9     | 7,7      | 0,7        | 0,06                    | 88                  | 98/202  | 22<br>65 <sup>b</sup> |
| 21              |  | 2,5     | 158      | 300        | 80                      | ---                 | 169/90  | 22<br>65 <sup>b</sup> |
| 22              |  | 6,7     | 6,5      | 11         |                         |                     | 102/209 | 22<br>66 <sup>b</sup> |

a Partial Thromboplastin Time (Inhibitorkonzentration  $10^{-5}$  M),  
Leerwert  $59 \pm 5,4$  sec.;

b Ref. synth.;

c Ref. 62);

d freundliche Gabe von Herrn Dr. H. L o e w e , Hoechst AG,  
Frankfurt/a.M.

blättchenaggregation zu 20 % hemmt, hat 22 überhaupt keine Wirkung. Die plasmainduzierte Blutblättchenagglutination wird durch das Sulfon 21 nur schwach beeinflusst. Die Indolverbindung 22 verlängert diese Zeit um das 6-fache in einer  $2 \times 10^{-5}$  molaren Konzentration. 20 und 21 könnten zur Unterscheidung zwischen Trypsin und trypsinähnlichen Enzymen, wie z.B. Akro-sin, herangezogen werden. Der Einfluß der beiden Substanzen auf die PTT ist gering. Hier offenbaren die Verbindungen 18 und 19 eine sehr gute Wirksamkeit, wobei das verdoppelte Benzofuranmolekül eine Spitzenposition einnimmt.

Die Hemmwerte von Thrombin können eine solche Wirksamkeit nicht erklären.

H e i m b u r g e r <sup>62)</sup> hat 19 in mehreren Gerinnungssystemen getestet und findet mit einer  $6 \times 10^{-5}$  molaren Lösung eine Verlängerung der exogenen Gerinnung (Quick-Test) um 119 Sek. im endogenen System (PTT) 31 Sek. und keine Beeinträchtigung der Thrombin-induzierten Fibrinolyse (Koagulometer-Methode).

Bei Einzelbestimmungen der Blutgerinnungsenzyme mit chromogenen Substraten hemmt die gleiche Konzentration von Nr. 19 Thrombin zu 10 %, Plasmin zu 46 %, Kallikrein zu 51 %, Faktor Xa zu 97 %, Urokinase zu 27 %, nicht aber die Kombination der Faktoren XIa und XIIa, obwohl Faktor XIIa alleine zu 36 % gehemmt wird.

## 1.6. Eigene Messungen

Die unter Ref. aufgeführten Literaturhinweise 63 - 95 geben die Synthese der Verbindungen an.

### 1.6.1. Allgemeine Angaben

Der Meßansatz ist in Kapitel 1.7.1.1. beschrieben. Der Zahlenwert KI gibt die Dissoziationskonstante des Trypsin-Inhibitor-komplexes an und hat die Benennung ( $\mu\text{M}$ ). Die Messwerte sind nach D i x o n <sup>96)</sup> berechnet. Wenn nicht besonders vermerkt, war die Reaktionskinetik linear. Wenn keine Standardabweichung angegeben ist, handelt es sich um eine Einfachbestimmung. In 108 Mehrfachbestimmungen ergab sich durchschnittlich ein Variationskoeffizient von 14 %.

Die Hemmcharakteristik aller Substanzen entspricht der einer kompetitiven Inhibition.

Die Symbole a-e der Zahlenwerte bedeuten:

a Messansatz mit Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler (s. Kapitel 1.7.5.).

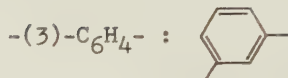
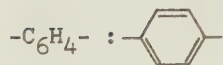
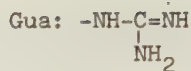
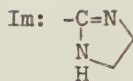
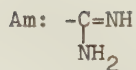
b  $\text{ID}_{50}$ -Wert, korrigiert: Inhibitorkonzentration, bei der 50 Prozent der Enzymaktivität gehemmt wird. Die ungenauere Auswertung (s. Kapitel 1.7.2.1.) wurde bei schlecht wirksamen Substanzen mit hoher Eigenfärbung, schlechter Löslichkeit oder einer unter c oder d aufgeführten Eigenschaft angewandt.

c Keine lineare Kinetik: Mit steigender Inhibitorkonzentration "progressive Hemmung" (Abbildung 7).

d Keine lineare Kinetik: Mit steigender Inhibitorkonzentration "degressive Hemmung" (Abbildung 6).

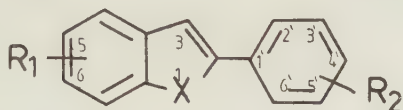
Maximale, eingesetzte Konzentration zeigt keine Hemmung.

KI-Wert ist wohl zehnfach größer.



Unter den Symbolen f-y der Substituentensummenformeln sind am Fuß der Tabelle die betreffenden Strukturformeln angegeben.

#### 1.6.2. Ergebnisse der Inhibitionsversuche mit Trypsin

1.6.2.1. KI-Werte von Typ A<sub>1</sub> in Tabelle 7

| Nr. | X  | R <sub>1</sub>                                                | R <sub>2</sub>                                                 | zusätzlicher Rest | KI (μM)                 | Code-Nr. | Ref. |
|-----|----|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------|----------|------|
| 20  | S  | Am(6)                                                         | Am(4')                                                         |                   | 2,0<br>(±0,27)          | 98/202   | 65   |
| 23  | NH | Am(6)                                                         | Am(4')                                                         |                   | 4,9<br>(±0,47)          | 102/198  | 66   |
| 24  | O  | Am(5)                                                         | Am(4')                                                         |                   | 5,8<br>(±0,23)          | 150/49   | 66   |
| 25  | O  | Am(6)                                                         | Am(4')                                                         |                   | 74                      | 150/64   | 66   |
| 26  | NH | Am(5)                                                         | Gua(4')                                                        |                   | 2,5<br>(±0,27)          | 272/143  | 73   |
| 27  | O  | Am(5)                                                         | Gua(4')                                                        |                   | 5,1                     | 283/70   | 75   |
| 28  | O  | Gua(5)                                                        | Am(4')                                                         |                   | 6,2                     | 283/72   | 75   |
| 29  | O  | Gua(5)                                                        | Gua(4')                                                        |                   | 220                     | 283/68   | 75   |
| 30  | O  | Am(5)                                                         | Im(4')                                                         |                   | 12 <sup>a</sup>         | 260/148  | 75   |
| 31  | O  | Im(5)                                                         | Am(4')                                                         |                   | 27                      | 260/158  | 75   |
| 32  | O  | NH <sub>2</sub> (5)                                           | Am(4')                                                         |                   | 38 <sup>a</sup>         | 260/136  | 75   |
| 33  | O  | Am(5)                                                         | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup> (4') |                   | 5,1 <sup>a</sup>        | 260/130  | 75   |
| 34  | O  | Im(5)                                                         | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup> (4') |                   | 100 <sup>a</sup>        | 260/115  | 75   |
| 35  | O  | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup> (5) | Am(4')                                                         |                   | 15 <sup>a</sup><br>(±0) | 260/135  | 75   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; f C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> = -N=CH-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Fortsetzung Tabelle 7: Typ A<sub>1</sub>

| Nr. | X   | R <sub>1</sub>                                                | R <sub>2</sub>                                                 | zusätzlicher Rest                                   | KI (μM)           | Code-Nr. | Ref |
|-----|-----|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------|----------|-----|
| 36  | O   | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup> (5) | Im(4')                                                         |                                                     | 100               | 260/134  | 75  |
| 37  | O   | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup> (5) | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup> (4') |                                                     | 100               | 260/132  | 75  |
| 38  | O   | Am(5)                                                         | NO <sub>2</sub> (4')                                           |                                                     | 7,3<br>(±0,3)     | 290/7    | 70  |
| 39  | S   | Gua(5)                                                        | Gua(4')                                                        |                                                     | 150 <sup>b</sup>  | 159/97   | 77  |
| 40  | S   | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> <sup>g</sup> (6) | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> <sup>g</sup> (4') |                                                     | 115 <sup>a</sup>  | 172/23   | 78  |
| 41  | S   | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> <sup>h</sup> (5) | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> <sup>h</sup> (4') |                                                     | 18 <sup>abd</sup> | 173/91   | 67  |
| 42  | N-R | Am(6)                                                         | Am(4')                                                         | -CH <sub>2</sub> -Am(1)                             | 1,2               | 299/40   | 69  |
| 43  | N-R | Am(6)                                                         | Am(4')                                                         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Am(1)              | 5,9               | 271/128  | 69  |
| 44  | N-R | Am(6)                                                         | Am(4')                                                         | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (1) | 18                | 271/121  | 69  |
| 45  | NH  | Am(6)                                                         | H                                                              |                                                     | 3,9               | 271/179  | 69  |
| 46  | NH  | Am(6)                                                         | NH <sub>2</sub> (4')                                           |                                                     | 3,8               | 272/153  | 73  |
| 47  | NH  | Am(5)                                                         | NH <sub>2</sub> (4')                                           |                                                     | 5,2<br>(±0,82)    | 272/140  | 73  |
| 48  | NH  | Am(6)                                                         | NHCOCH <sub>3</sub> (4')                                       |                                                     | 3,2               | 272/161  | 73  |
| 49  | NH  | Am(6)                                                         | NHCOCH <sub>3</sub> (4')                                       |                                                     | 2,5               | 272/49   | 73  |
| 50  | NH  | Am(6)                                                         | OH(3')                                                         |                                                     | 3,5               | 287/110  | 74  |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert;

d keine lineare Kinetik;

g C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N<sub>4</sub> =  $\begin{array}{c} \text{-CH=N-NH-C=NH;} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array}$     h C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>5</sub> =  $\text{-NH-N=N-} \langle \text{benzene ring} \rangle \text{-Am}$

f C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> =  $\text{-N=CH-N(CH}_3)_2$

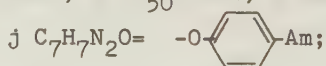
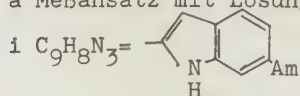
Fortsetzung Tabelle 7: Typ A<sub>1</sub>

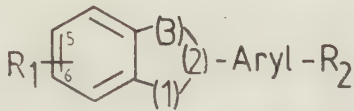
| Nr. | X  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>                        | zusätzlicher Rest                                | KI (μM)         | Code-Nr. | Ref. |
|-----|----|----------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------|----------|------|
| 51  | NH | Am(6)          | OH(4')                                |                                                  | 5,2             | 287/36   | 74   |
| 52  | NH | Am(6)          | OCH <sub>3</sub> (4')                 |                                                  | 3,2             | 287/43   | 74   |
| 53  | NH | Am(6)          | OCH <sub>3</sub> (4')                 | -OCH <sub>3</sub> (2')                           | 1,2<br>(±0,06)  | 287/75   | 74   |
| 54  | NH | Am(6)          | OCH <sub>3</sub> (4')                 | -OCH <sub>3</sub> (3')<br>-OCH <sub>3</sub> (5') | 0,54            | 287/83   | 74   |
| 55  | NH | Am(6)          | Am(4')                                | -OH (2')                                         | 2,5             | 287/89   | 74   |
| 56  | NH | Am(6)          | Am(4')                                | -OCH <sub>3</sub> (2')                           | 1,3             | 287/120  | 74   |
| 57  | NH | Am(6)          | COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> (4') |                                                  | 2,9             | 287/108  | 74   |
| 58  | O  | CN (5)         | Am(4')                                | -OCH <sub>3</sub> (6)                            | 15 <sup>a</sup> | 260/89   | 75   |
| 59  | NH | Am(6)          | Am(4')                                | -Cl(3)                                           | 8,8             | 271/165  | 66   |
| 60  | NH | Am(6)          | Am(4')                                | -Br(3)                                           | 11              | 192/219  | 69   |
| 61  | NH | Am(6)          | Am(4')                                | -SCH <sub>3</sub> (3)                            | 15              | 271/64   | 69   |
| 62  | NH | Am(5)          | Am(4')                                | -SCH <sub>3</sub> (3)                            | 4,3             | 271/62   | 69   |
| 63  | NH | Am(5)          | Am(4')                                | -SOCH <sub>3</sub> (3)                           | 4,5             | 271/86   | 69   |
| 64  | NH | Am(5)          | Am(4')                                | -SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (3)             | 12              | 271/70   | 69   |
| 65  | NH | Am(6)          | Am(4')                                | -NH <sub>2</sub> (3)                             | 2,0             | 225/144  | 72   |
| 66  | S  | Am(5)          | Am(4')                                | -NH <sub>2</sub> (3)                             | 1,8<br>(±0,12)  | 192/185  | 70   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler;

Fortsetzung Tabelle 7: Typ A<sub>1</sub>

| Nr. | X               | R <sub>1</sub>                                                     | R <sub>2</sub> | zusätzlicher Rest                                                        | KI (μM)                     | Code-Nr. | Ref. |
|-----|-----------------|--------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------|------|
| 67  | SO <sub>2</sub> | Am(5)                                                              | Am(4')         | -NH <sub>2</sub> (3)                                                     | 150 <sup>b</sup>            | 192/287  | 70   |
| 68  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -NHCOCH <sub>3</sub> (3)                                                 | 25                          | 225/166  | 72   |
| 69  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -NHCOCH <sub>2</sub> (3)<br> <br>HOOCCH <sub>2</sub>                     | 29<br>(±9,5)                | 225/168  | 72   |
| 70  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> NH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> (3)     | 6,3                         | 271/106  | 69   |
| 71  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -CH=N-OH(3)                                                              | 11                          | 271/50   | 69   |
| 72  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> OH(3)                                                   | 9,2                         | 271/151  | 69   |
| 73  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -COOH(3)                                                                 | 37                          | 299/20   | 69   |
| 74  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -COOCH <sub>3</sub> (3)                                                  | 17 <sup>a,d</sup><br>(±1,8) | 299/14   | 69   |
| 75  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sup><math>\frac{1}{3}</math></sup> (3) | 1,8                         | 271/170  | 69   |
| 76  | NH              | Am(6)                                                              | H              | -C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sup><math>\frac{1}{3}</math></sup> (3) | 1,7                         | 299/27   | 69   |
| 77  | NH              | Am(6)                                                              | Am(4')         | -CN(3)                                                                   | 38                          | 299/29   | 69   |
| 78  | NH              | C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sup>j</sup><br>(6) | Am(4')         | H                                                                        | 2,1<br>(±0,09)              | 186/146  | 68   |
| 79  | O               | Am(5)                                                              | Am(4')         | -CH <sub>3</sub> (3)                                                     | 5,1 <sup>a</sup>            | 150/87   | 66   |
| 80  | O               | Am(5)                                                              | Am(4')         | -NO <sub>2</sub> (3)                                                     | 88                          | 301/9    | 79   |
| 81  | S               | Am(5)                                                              | Am(4')         | -NO <sub>2</sub> (3)                                                     | 15                          | 192/77   | 70   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert; d keine lineare Kine

1.6.2.2. KI-Werte von Typ A<sub>2</sub> in Tabelle 8

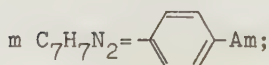
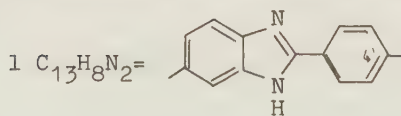
| Nr. | -(1)-(2)-(3)-                                                        | R <sub>1</sub>      | R <sub>2</sub> | -Aryl-                                      | KI-( $\mu$ M)     | Code-Nr. | Ref. |
|-----|----------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------|---------------------------------------------|-------------------|----------|------|
| 82  | $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$<br>            <br>CH <sub>3</sub> | Am(5)               | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 2,1               | 171/51   | 66   |
| 83  | $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$<br>            <br>CH <sub>3</sub> | Am(6)               | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 11                | 141/119  | 66   |
| 84  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{CH}-$<br>                                 | Am(6)               | Am(2')         | $-\text{C}_4\text{H}_2\text{S}^{\text{k}}-$ | 1,9               | 192/136  | 70   |
| 21  | $-\text{SO}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$<br>                            | Am(5)               | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 2,8               | 161/90   | 65   |
| 85  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-$<br> <br>NH                           | Am(5)               | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 3,8               | 174/88   | 83   |
| 86  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-$<br> <br>NH                           | Gua(5)              | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 4,8               | 240/158  | 80   |
| 87  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-$<br> <br>NH                           | Gua(5)              | CN(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 3500 <sup>b</sup> | 240/138  | 80   |
| 88  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-$<br> <br>NH                           | NH <sub>2</sub> (5) | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 23                | 240/162  | 80   |
| 89  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-$<br> <br>O                            | Am(5)               | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 35                | 240/130  | 80   |
| 90  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-$<br> <br>S                            | Am(5)               | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 21 <sup>a</sup>   | 240/99   | 80   |
| 91  | $-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-$<br> <br>O=S=O                        | Am(5)               | Am(4')         | $-\text{C}_6\text{H}_4-$                    | 700 <sup>b</sup>  | 240/142  | 80   |

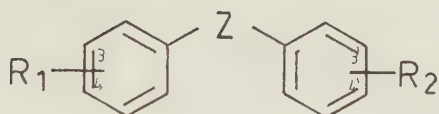
a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert; k C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>S = 

Fortsetzung Tabelle 8: Typ A<sub>2</sub>

| Nr. | -(1)-(2)-(3)-                                                                            | R <sub>1</sub>                                       | R <sub>2</sub>         | -Aryl-                                                        | KI-<br>(μM)         | Code-<br>Nr. | Ref. |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|--------------|------|
| 92  | -NH - C = N-<br>                                                                         | Am(5)                                                | -OCH <sub>3</sub> (4') | -C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> <sup>l</sup> - | >100                | 43356        |      |
| 93  | -NH - C = N-<br>                                                                         | Am(5)                                                | -Cl(4')                | -C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> <sup>l</sup> - | 280 <sup>a, b</sup> | 43358        |      |
| 94  | -S - C = N-<br> <br>NH                                                                   | Am(6)                                                | Am(4')                 | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                              | 5,1 <sup>a</sup>    | 240/120      | 80   |
| 95  | =N - N - CH=<br>                                                                         | Am(5)                                                | Am(4')                 | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                              | 13                  | 137/108      | 81   |
| 96  | =N - N - N=<br>                                                                          | -OCH <sub>3</sub><br>(5)<br>-OCH <sub>3</sub><br>(6) | Am(4')                 | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                              | 2,8<br>(±0,54)      | 235/136      | 82   |
| 97  | =N - N - N=<br>                                                                          | Am(5)                                                | Am(4')                 | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                              | 20                  | 137/45       | 82   |
| 98  | -N - N = N-<br> <br>NH<br> <br>C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>m</sup> | Am(5)                                                |                        |                                                               | 33                  | 240/59       | 80   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert;



1.6.2.3. KI-Werte von Typ B in Tabelle 9

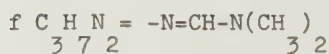
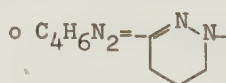
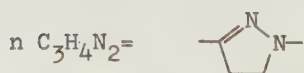
| Nr. | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Z                                                | zusätzlicher Rest                                     | KI (µM)                   | Code-Nr. | Ref. |
|-----|----------------|----------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|----------|------|
| 99  | Am(4)          | Am(4')         |                                                  |                                                       | 32<br>( <sup>±</sup> 8,9) | 235/161  | 82   |
| 100 | Am(4)          | Am(4')         | -CH=CH-                                          | -NHCOCH <sub>3</sub> (2)<br>-NHCOCH <sub>3</sub> (2') | 30                        | 268/     | 85   |
| 01  | Am(4)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> CO-                             |                                                       | 9,4 <sup>a</sup>          | 192/282  | 70   |
| 02  | Im(4)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> CO-                             | -NO <sub>2</sub> (2)                                  | 19                        | 192/208  | 70   |
| 3   | Am(4)          | Am(4')         | -NH=N=N-                                         |                                                       | 5,7 Berenil <sup>R</sup>  |          |      |
| 03  | Am(4)          | Am(4')         | -NH=N=N-                                         |                                                       | 6,8                       | 261/81   | 84   |
| 04  | Gua(4)         | Am(4')         | -NH=N=N-                                         |                                                       | 6,4                       |          |      |
| 05  | Gua(4)         | Gua(4')        | -NH=N=N-                                         |                                                       | 530 <sup>b</sup>          |          |      |
| 06  | Am(4)          | Am(4')         | -CH=N-NH-                                        |                                                       | 1,8                       | 276/69   | 86   |
| 07  | Am(4)          | Im(4')         | -CH=N-NH-                                        |                                                       | 6,0                       | 276/110  | 86   |
| 08  | Am(4)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> -NH-NH-                         |                                                       | 9,0                       | 290/27   | 70   |
| 09  | Am(4)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> | -NO <sub>2</sub> (2)                                  | 11                        | 280/52   | 11   |
| 10  | Am(4)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO-             |                                                       | 3,7<br>( <sup>±</sup> 0)  | 300/7    | 88   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert;

## Fortsetzung von Tabelle 9: Typ B

| Nr. | R <sub>1</sub>                                                   | R <sub>2</sub>                                                    | Z                                                          | zusätzlicher Rest                               | KI (µM)                     | Code-Nr. | Ref. |
|-----|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|----------|------|
| 111 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -CH=N-N=CH-                                                | -OCH <sub>3</sub> (3)<br>-OCH <sub>3</sub> (3') | 4,0                         | 276/64   | 86   |
| 4   | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> O-                       |                                                 | 2,2 Pentamidin <sup>R</sup> |          |      |
| 112 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> O-                       |                                                 | 43                          | 260/80   | 75   |
| 113 | Am(4)                                                            | Im(4')                                                            | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> O-                       |                                                 | 5,6                         | 261/81   | 84   |
| 114 | Im(4)                                                            | Im(4')                                                            | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> O-                       |                                                 | >1000                       | 261/63   | 84   |
| 115 | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup><br>(4) | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup><br>(4') | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> O-                       |                                                 | >1000                       | 260/180  | 75   |
| 116 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                       |                                                 | 1,4                         | 186/122  | 68   |
| 117 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -CH=CH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CH=CH-               |                                                 | 8,9 <sup>a</sup>            | 192/205  | 70   |
| 118 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -NHOC-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CONH-                 |                                                 | 7,4 <sup>b</sup>            | 261/43   | 94   |
| 119 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -NH-N=CH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CH=N-NH-           |                                                 | 2,1<br>(±0,12)              | 276/89   | 86   |
| 120 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> S <sup>k</sup>              |                                                 | 2,4                         | 186/113  | 68   |
| 121 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> <sup>n</sup> |                                                 | 2,7                         | 276/99   | 86   |
| 122 | Am(4)                                                            | Am(4')                                                            | -C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> <sup>o</sup> |                                                 | 2,7                         | 296/40   | 86   |

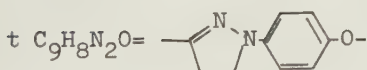
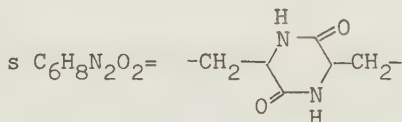
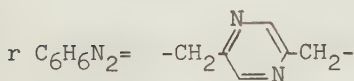
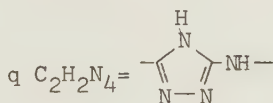
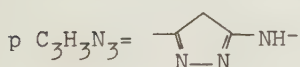
a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert; k C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>S= 

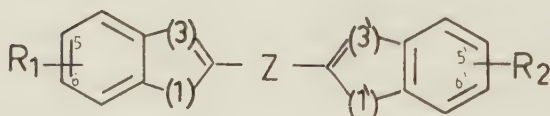


Fortsetzung Tabelle 9, Typ B

| Nr. | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Z                                                                           | zusätzlicher Rest | KI (μM)          | Code-Nr. | Ref. |
|-----|----------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|----------|------|
| 123 | Am(4)          | Am(4')         | -C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> <sup>p</sup> -                |                   | 3,1 <sup>a</sup> | 223/90   | 89   |
| 124 | Am(4)          | Am(4')         | -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N <sub>4</sub> <sup>q</sup> -                |                   | 2,9              | 189/146  | 95   |
| 125 | Am(4)          | Am(4')         | -C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> <sup>r</sup> -                |                   | 6,9              | 174/158  | 68   |
| 126 | Am(4)          | Am(4')         | -C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>s</sup> - |                   | 180 <sup>b</sup> | 276/158  | 86   |
| 127 | Am(4)          | Am(4')         | -C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sup>t</sup> -              |                   | 3,3              | 276/153  | 86   |
| 128 | Am(4)          | Am(4')         | -S-CH <sub>2</sub> -                                                        |                   | 6,9              | 137/76   | 81   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert;



1.6.2.4. KI-Werte von Typ C in Tabelle 10

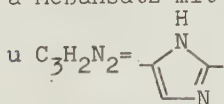
| Nr. | (1) | (3) | (1') | (3') | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Z                                                                 | KI<br>( $\mu$ M)                    | Code-<br>Nr. | Re |
|-----|-----|-----|------|------|----------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------|----|
| 129 | NH  | CH  | NH   | CH   | Am(6)          | Am(6')         |                                                                   | 0,76                                | 288/50       | 9  |
| 17  | NH  | N   | NH   | N    | Am(5)          | Am(5')         | -CH <sub>2</sub> -                                                | 0,13<br>( $\pm 0,038$ )             | 41347        | 5  |
| 130 | NH  | CH  | NH   | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -CH=CH-                                                           | 1,4                                 | 272/154      | 7  |
| 131 | NH  | CH  | NH   | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -                                | 0,49                                | 272/175      | 7  |
| 132 | NH  | CH  | NH   | CH   | Am(5)          | Am(6')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -                                | 0,93                                | 272/181      | 7  |
| 133 | NH  | CH  | NH   | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                                  | 5,2 <sup>b,d</sup><br>( $\pm 1,2$ ) | 287/186      | 7  |
| 134 | NH  | CH  | NH   | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - | 7,9<br>( $\pm 0,44$ )               | 261/87       | 8  |
| 135 | NH  | CH  | NH   | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -CH=N-N=CH-                                                       | 7,5                                 | 253/55       | 6  |
| 136 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH=N-N=CH-                                                       | 11                                  | 283/115      | 7  |
| 137 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(6')         | -CH=CH-                                                           | 2,1<br>( $\pm 0,45$ )               | 279/31       | 6  |
| 138 | O   | CH  | O    | CH   | Im(5)          | Im(6')         | -CH=CH-                                                           | > 100                               | 279/37       | 6  |
| 139 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(6')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -                                | 1,9                                 | 279/28       | 6  |

b ID<sub>50</sub>-Wert; d keine lineare Kinetik

Fortsetzung Tabelle 10: Typ C

| Nr. | (1) | (3) | (1') | (3') | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Z                                                            | KI<br>( $\mu$ M)                         | Code-<br>Nr. | Ref. |
|-----|-----|-----|------|------|----------------|----------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------|------|
| 140 | O   | CH  | O    | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -CH=CH-                                                      | 3,3                                      | 279/25       | 64   |
| 141 | O   | CH  | O    | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -                           | 5,2                                      | 279/32       | 64   |
| 142 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH=C(CH <sub>3</sub> )-                                     | 7,9 <sup>a</sup><br>( $\pm 1,9$ )        | 150/192      | 63   |
| 143 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-                      | 0,67<br>( $\pm 0,012$ )                  | 150/162      | 63   |
| 144 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH <sub>2</sub> SCH <sub>2</sub> -                          | 5,8                                      | 283/60       | 75   |
| 145 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH <sub>2</sub> SOCH <sub>2</sub> -                         | 4,7 <sup>a</sup>                         | 283/89       | 75   |
| 146 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -           | 12 <sup>a</sup>                          | 283/75       | 75   |
| 147 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH=CH-CO-                                                   | 0,76                                     | 283/114      | 75   |
| 148 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -(CH=CH) <sub>2</sub> -                                      | 1,2<br>( $\pm 0,45$ )                    | 283/23       | 75   |
| 149 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -                           | 0,9<br>( $\pm 0,27$ )                    | 283/24       | 75   |
| 150 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -(CH=CH) <sub>3</sub> -                                      | 1,7                                      | 283/114      | 75   |
| 151 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -                           | 1,4 <sup>a</sup>                         | 283/81       | 75   |
| 152 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH=CH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                       | 5,7 <sup>a, b, c</sup><br>( $\pm 0,53$ ) | 283/65       | 75   |
| 153 | O   | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> <sup>u</sup> - | 1,0                                      | 186/232      | 68   |

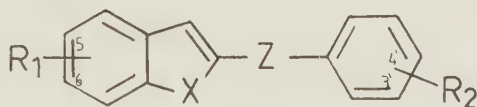
a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert; c keine lineare Kinetik



Fortsetzung Tabelle 10: Typ C

| Nr. | (1) | (3) | (1') | (3') | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Z                                  | KI<br>( $\mu$ M)                    | Code-<br>Nr. | Ref |
|-----|-----|-----|------|------|----------------|----------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------|-----|
| 154 | S   | CH  | S    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH=CH-                            | 16 <sup>a</sup>                     | 186/170      | 72  |
| 155 | S   | CH  | S    | CH   | Im(6)          | Im(6')         | -CH=CH-                            | > 100                               | 278/140      | 90  |
| 156 | S   | CH  | S    | CH   | Am(6)          | Am(5')         | -CH=CH-                            | 0,55<br>( $\pm 0,017$ )             | 278/133      | 90  |
| 157 | S   | CH  | NH   | CH   | Am(5)          | Am(6')         | -CH=CH-                            | 1,0<br>( $\pm 0,10$ )               | 278/90       | 90  |
| 158 | NH  | CH  | O    | CH   | Im(6)          | Im(5')         | -CH=CH-                            | > 100                               | 252/152      | 64  |
| 159 | NH  | CH  | O    | CH   | Am(6)          | Am(5')         | -CH=CH-                            | 1,3<br>( $\pm 0,31$ )               | 253/50       | 64  |
| 160 | NH  | CH  | O    | CH   | Am(6)          | Am(5')         | -CH=CH-<br>(cis/trans)             | 1,4                                 | 253/148      | 64  |
| 19  | NH  | CH  | O    | CH   | Am(6)          | Am(5')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - | 0,60<br>( $\pm 0$ )                 | 253/147      | 64  |
| 161 | NH  | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(5')         | -CH=CH-                            | 0,84 <sup>c</sup><br>( $\pm 0,07$ ) | 253/138      | 64  |
| 162 | NH  | CH  | O    | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -CH=CH-                            | 2,0<br>( $\pm 0,54$ )               | 279/33       | 64  |
| 163 | NH  | CH  | O    | CH   | Im(6)          | Im(6')         | -CH=CH-                            | > 100                               | 279/36       | 64  |
| 164 | NH  | CH  | O    | CH   | Am(6)          | Am(6')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - | 12 <sup>c</sup><br>( $\pm 2,5$ )    | 279/29       | 64  |
| 165 | NH  | CH  | O    | CH   | Am(5)          | Am(6')         | -CH=CH-                            | 2,3                                 | 279/34       | 64  |
| 166 | NH  | CH  | O    | CH   | Im(5)          | Im(6')         | -CH=CH-                            | > 100                               | 279/138      | 64  |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert; c keine lineare Kinetik

1.6.2.5. KI-Werte von Typ D in Tabelle 11

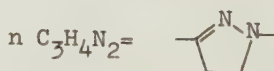
| Nr. | X  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Z                                      | KI<br>( $\mu$ M)        | Code-<br>Nr. | Ref. |
|-----|----|----------------|----------------|----------------------------------------|-------------------------|--------------|------|
| 167 | S  | Am(5)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> -                     | 1,2                     | 159/86       | 77   |
| 168 | S  | Am(5)          | Am(4')         | -CO-                                   | 8,0 <sup>a</sup>        | 159/78       | 77   |
| 169 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH=CH-                                | 3,1                     | 150/119      | 76   |
| 170 | NH | Am(6)          | Am(4')         | -CH=CH-                                | 2,8                     | 268/73       | 85   |
| 171 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -     | 3,3                     | 150/132      | 76   |
| 172 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> O-                    | 4,5                     | 150/175      | 76   |
| 173 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> S-                    | 3,7                     | 150/155      | 76   |
| 174 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH=C(CH <sub>3</sub> )-               | 11                      | 150/161      | 76   |
| 175 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH=C(CH <sub>3</sub> )-               | 4,0 <sup>a</sup>        | 150/166      | 76   |
| 176 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )- | 0,74<br>( $\pm 0,018$ ) | 150/162      | 76   |
| 177 | NH | Am(6)          | Am(4')         | -CONH-                                 | 2,9                     | 253/124      | 64   |
| 178 | NH | Im(6)          | Im(4')         | -CONH-                                 | > 100                   | 253/155      | 64   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler;

Fortsetzung Tabelle 11: Typ D

| Nr. | X  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Z                                                            | KI<br>( $\mu$ M)       | Code-<br>Nr. | Ref |
|-----|----|----------------|----------------|--------------------------------------------------------------|------------------------|--------------|-----|
| 179 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CONH-                                                       | 12                     | 253/125      | 64  |
| 180 | O  | Im(5)          | Im(4')         | -CONH-                                                       | > 100                  | 253/156      | 64  |
| 181 | O  | Im(6)          | Im(4')         | -CONH-                                                       | > 100                  | 279/41       | 64  |
| 182 | O  | Am(5)          | H              | -CH=CHCO-                                                    | 5,9<br>( $\pm 0,36$ )  | 300/11       | 88  |
| 183 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -CH=N-NH-                                                    | 4,3                    | 283/96       | 75  |
| 184 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> <sup>n</sup> - | 4,7                    | 276/119      | 86  |
| 185 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -C(CH <sub>3</sub> )=N-NH-                                   | 7,0                    | 283/134      | 75  |
| 186 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -(CH=CH) <sub>2</sub> -                                      | 0,65<br>( $\pm 0,15$ ) | 283/54       | 75  |
| 187 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -                           | 0,60                   | 283/56       | 75  |
| 188 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -(CH=CH) <sub>3</sub> -                                      | 0,95                   | 283/87       | 75  |
| 189 | O  | Am(5)          | Am(4')         | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -                           | 1,1 <sup>a</sup>       | 283/105      | 75  |
| 190 | NH | Am(5)          | Am(4')         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                           | 1,3 <sup>a</sup>       | 261/171      | 84  |
| 191 | NH | Am(6)          | Am(4')         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                           | 1,6<br>( $\pm 0,18$ )  | 186/134      | 68  |
| 192 | NH | Am(6)          | H              | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-CH <sub>2</sub> -          | 3,5 <sup>a</sup>       | 287/44       | 74  |
| 193 | NH | Am(6)          | Am(3')         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                           | 1,6<br>( $\pm 0,24$ )  | 288/115      | 84  |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler;

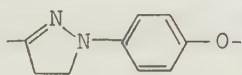


Fortsetzung Tabelle 11: Typ D

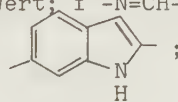
| Nr. | X  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>                                                 | Z                                                                    | KI<br>( $\mu$ M)                       | Code-<br>Nr. | Ref. |
|-----|----|----------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------|------|
| 194 | NH | Am(5)          | Am(4')                                                         | -(3)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                               | 0,51                                   | 288/59       | 84   |
| 195 | NH | Am(6)          | NH <sub>2</sub> (4')                                           | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                                   | 2,1                                    | 278/99       | 74   |
| 196 | O  | Am(5)          | Am(4')                                                         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                                   | 2,5 <sup>a</sup>                       | 260/153      | 75   |
| 197 | O  | Am(5)          | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> <sup>f</sup> (4') | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                                   | 2,5 <sup>a</sup><br>( $\pm$ 0)         | 283/28       | 75   |
| 198 | NH | Am(6)          | Am(4')                                                         | -CH=CH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                             | 0,23 <sup>b, c</sup><br>( $\pm$ 0,027) | 288/4        | 84   |
| 199 | NH | Am(6)          | Am(4')                                                         | -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O- | 0,56                                   | 288/6        | 84   |
| 200 | NH | Am(6)          | Am(4')                                                         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-CH <sub>2</sub> -                  | 2,9 <sup>a</sup>                       | 287/37       | 74   |
| 201 | O  | Am(5)          | Am(4')                                                         | -CH=CH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -O-                             | 0,9 <sup>a</sup><br>( $\pm$ 0,083)     | 283/83       | 75   |
| 202 | O  | Am(5)          | Am(4')                                                         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -NH-N=N-                              | 2,8 <sup>a</sup>                       | 150/245      | 67   |
| 203 | O  | Am(5)          | Am(3')                                                         | -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -NH-N=N-                              | 2,5                                    | 150/251      | 67   |
| 204 | S  | Am(5)          | Am(4')                                                         | -CONH-                                                               | 4,6 <sup>a</sup>                       | 159/165      | 77   |
| 205 | NH | Am(6)          | -OH(4')                                                        | -C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> N- <sup>v</sup>                       | 66 <sup>a, b</sup>                     | 287/66       | 74   |
| 206 | NH | Am(6)          | Am(4')                                                         | -C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> N- <sup>v</sup>                       | 2,0                                    | 287/27       | 74   |
| 207 | O  | Am(5)          | Am(4')                                                         | -C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O- <sup>t</sup>        | 0,92                                   | 276/150      | 86   |

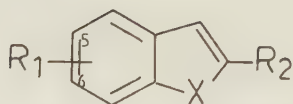
a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert; f -N=CH-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;

t C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O =



; v C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N=



1.6.2.6. KI-Werte von Typ E in Tabelle 12

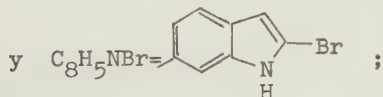
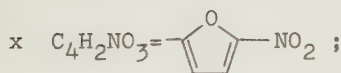
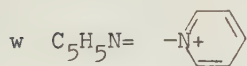
| Nr. | X  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>                                                 | KI<br>( $\mu$ M) | Code-<br>Nr. | Ref. |
|-----|----|----------------|----------------------------------------------------------------|------------------|--------------|------|
| 208 | NH | Am(6)          | -Am                                                            | 15               | 261/115      | 84   |
| 209 | O  | Am(5)          | -CHO                                                           | 21               | 283/103      | 75   |
| 210 | O  | Am(5)          | -CONH <sub>2</sub>                                             | 68               | 301/12a      | 79   |
| 211 | NH | Am(6)          | -CONH <sub>2</sub>                                             | 12               | 288/64       | 94   |
| 212 | O  | Am(5)          | -COCH <sub>3</sub>                                             | 63               | 288/138      | 75   |
| 213 | NH | Am(6)          | -CH=CH-Am                                                      | 3,6              | 290/23       | 70   |
| 214 | NH | Am(6)          | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -Am                           | 17               | 290/46       | 70   |
| 215 | NH | Am(6)          | -COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                              | 18               | 273/36       | 91   |
| 216 | O  | Am(5)          | -CH=CHCOOCH <sub>3</sub>                                       | 25 <sup>a</sup>  | 192/248      | 70   |
| 217 | O  | Am(5)          | -CH=N-NH-C(=S)NH <sub>2</sub>                                  | 10 <sup>a</sup>  | 283/58       | 75   |
| 218 | O  | Am(5)          | -CH=N-NH-C(=NH)NH <sub>2</sub>                                 | 23               | 283/62       | 23   |
| 219 | O  | Am(5)          | -CH=N-NH-C(=O)CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 35               | 283/110      | 75   |
| 220 | O  | Am(5)          | -CH=N-NH-C(=O)CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> | 18               | 283/108      | 75   |

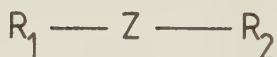
a Meßansatz mit Lösungsvermittler;

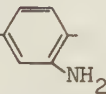
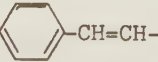
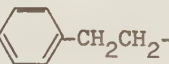
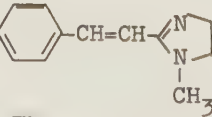
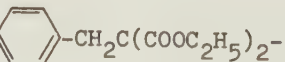
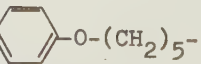
Fortsetzung Tabelle 12: Typ E

| Nr. | X  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>                                                                                         | KI<br>( $\mu$ M) | Code-<br>Nr. | Ref. |
|-----|----|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------|------|
| 221 | O  | Am(5)          | $-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}^{\text{w}}$ | 18               | 283/109      | 75   |
| 222 | O  | Am(5)          | $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_4\text{H}_2\text{N O}_3^{\text{x}}$                                     | 7,0 <sup>a</sup> | 290/13       | 70   |
| 223 | NH | Am(6)          | $-\text{C}_8\text{H}_5\text{NBr}^{\text{y}}$                                                           | > 100            | 288/24       | 84   |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler;



1.6.2.7. KI-Werte von Typ F in Tabelle 13

| Nr. | R <sub>1</sub>                                                 | R <sub>2</sub>      | Z                                                                                   | KI (μM)             | Code-Nr. | Ref |
|-----|----------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------|-----|
| 224 | Am                                                             | CHO                 |    | 116                 | 276/62   | 86  |
| 225 | $\begin{array}{c} \text{COCH}_3 \\   \\ \text{NH} \end{array}$ | CHO                 |    | > 2300 <sup>b</sup> | 276/61   | 86  |
| 226 | Am                                                             | NH <sub>2</sub>     |    | 29                  |          |     |
| 227 | Am                                                             | Cl                  |    | > 2000 <sup>b</sup> | 260/61   | 75  |
| 228 | Am                                                             | NH-NH <sub>2</sub>  |    | 21                  | 276/68   | 86  |
| 229 | Am                                                             | Am                  |    | 99                  | 290/18   | 70  |
| 230 | Am                                                             | Am                  |   | 47                  | 290/43   | 70  |
| 231 | Am                                                             | NO <sub>2</sub>     |  | 16 <sup>a</sup>     | 290/53   | 70  |
| 232 | Am                                                             | COOH                |  | 240 <sup>b</sup>    | 276/181  | 86  |
| 233 | Am                                                             | NHCOCH <sub>3</sub> |  | 705 <sup>b</sup>    | 276/180  | 86  |
| 234 | Am                                                             | NH <sub>2</sub>     |  | 44<br>(±2,7)        | 269/29   | 92  |

a Meßansatz mit Lösungsvermittler; b ID<sub>50</sub>-Wert;

Fortsetzung Tabelle 13: Typ F

| Nr. | R <sub>1</sub>                                            | R <sub>2</sub>                                            | Z                                   | KI (μM)           | Code-Nr. | Ref. |
|-----|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|----------|------|
| 235 | Am                                                        | Am                                                        |                                     | 21<br>(±5,6)      | 269/21   | 92   |
| 236 | Am                                                        | Am                                                        |                                     | 7,2<br>(±1,4)     | 269/24   | 92   |
| 237 | -                                                         | -                                                         |                                     | >100              |          |      |
| 238 | CN                                                        | -                                                         |                                     | >100              | 300/26   | 88   |
| 239 | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> <sup>g</sup> | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> <sup>g</sup> |                                     | 250 <sup>b</sup>  | 288/66   | 94   |
| 240 | Am                                                        | -                                                         |                                     | 19 <sup>a</sup>   | 300/27   | 88   |
| 241 | Am                                                        | -                                                         |                                     | 23 <sup>a</sup>   | 300/31   | 88   |
| 242 | Am                                                        | Am                                                        |                                     | 8,9               | 151/157  | 93   |
| 243 | Am                                                        | Am                                                        |                                     | 8,1               | 240/170  | 80   |
| 244 | Am                                                        | Am                                                        | -NH-N=CH(CH <sub>3</sub> )CH=N-NH-  | 800 <sup>b</sup>  |          |      |
| 245 | Am                                                        | Am                                                        | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> - | 7000 <sup>b</sup> | 235/138  | 95a  |

<sup>g</sup> C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N<sub>4</sub> =

### 1.6.3. Diskussion der Ergebnisse in Tabelle 7 - 13

Die Diskussion der Ergebnisse in Tabelle 7 - 13 befaßt sich zunächst mit der Art, dem Einfluß und der Stellung kationischer Substituenten. Sodann wird für die verschiedenen Typen der Ringgerüste der Einfluß der Heteroatome im kondensierten Benzolheterofünfringsystem und der Einfluß von Substituenten in diesem Fünfring behandelt.

#### 1.6.3.1. Variation der kationischen Flanken

Der planare Amidinrest garantiert die optimale Einpassung in die Spezifitätstasche. Der um ein Stickstoffatom verlängerte Guanidinrest erweist sich als wohl zu lang und ungeeignet (29,87).

Das gilt in gleichem Maße für den noch größeren Guanylhydrazonrest (40,240). Diese beiden großen kationischen Reste bewirken einheitlich eine hundertfach schlechtere Hemmung als die entsprechenden Amidinverbindungen.

Eine noch größere sterische Behinderung entfaltet ein Formamidinrest mit zweifach methyliertem, kationischen Stickstoff, der einer Imidazolinygruppe gleichzusetzen ist (36,37,115).

Bei dem Imidazoliny substituenten ist die kationische Ladung durch eine  $-CH_2-CH_2-$ Brücke abgeschirmt und dadurch für die Einpassung in die Substrattasche ungeeignet (114,138,158,163,166,178,180,181).

Die geringe Basenstärke einer aromatischen Aminogruppe ist für eine Bindung der Amidinogruppe unterlegen (32,88).

Eine Substitution in Nachbarstellung zur Amidinogruppe ergibt bei ortho- und meta-Derivaten eine sterische Behinderung und damit eine herabgesetzte Trypsinhemmung (226,112,100,102).

Ungeladene Flanken zeigen keine Affinität (238,239,87). Am Beispiel der Phenylbrenztraubensäure (8) fand Markwardt<sup>97)</sup> ähnliche Substituenteneinflüsse.

Die Abstufung der Substituentenwirksamkeit:

Amidin  $\gg$  Guanidin  $\approx$  Guanylhydrazon  $\gg \gg$  Formamidin  $\approx$  Imidazoliny ist

nicht nur auf das Heteroringsystem des Typs A beschränkt, sondern gilt auch für Phenylreste des Typs B, indem eine Amidino-Gruppe wieder der optimale Substituent ist; eine Imidazolinyl- oder Formamidin-Gruppe (115,116) ist ungeeignet.

Die Einlagerung der Guanidingruppe ist möglich, aber ebenso wie bei Typ A 100-fach schlechter (105).

Der Guanylhydrazonrest entspricht dem Guanidinrest. Eine Ausnahme von dieser Regel sind die 4-Guanidinobenzoesäurederivate (6, 7) mit ihrer hervorragenden, den korrespondierenden Amidinverbindungen überlegenen, Hemmung. Steht die Guanidingruppe jedoch in 3-Stellung, so fällt die Wirksamkeit wegen sterischer Hinderung drastisch um das Tausendfache <sup>51)</sup> und ist schlechter als die der entsprechenden Amidinverbindung.

Die hier getesteten Verbindungen haben alle in para-Stellung zur Guanidingruppe ein Stickstoff- (87,105), Sauerstoff- (29) oder Schwefelatom (39) und damit eine andere elektrochemische Voraussetzung als 6 und 7 mit der Carbonylfunktion.

#### 1.6.3.2. Einfluß der Substituentenstellung

Eine Verschiebung des Amidinrests im Heteroringsystem zwischen Stellung 5 und 6 oder im Phenylring zwischen 4' und 3' wirken sich nur wenig aus (46,47; 132,133;191,193;202,203).

Steht der Amidinrest in 7-Stellung <sup>22)</sup>, so entspricht das einer ungünstigen o-Substitution (s.o.).

Eine Ausnahme machen 24 und 25: Das 5-amidinsubstituierte Benzofuran ist 12 mal wirksamer als die 6-substituierte Verbindung.

Das über eine  $-CH_2CH_2-$ -Brücke mit 6-Amidinoindol verknüpfte 6-Amidinobenzofuran 164 unterscheidet sich stark von dem analogen 5-Amidinobenzofuran 19, welches neben der etwa 20-fach besseren Trypsinhemmung auch bei Faktor Xa 100-fach und bei der PTT etwa 5-fach stärker wirkt als 164 <sup>61)</sup>.

Der Einfluß der Stellung der Amidin-Gruppe am Benzofuran ist auch hier wieder entscheidend.

### 1.6.3.3. Bevorzugtes Ringsystem für die Bindungstasche

Durch unsymmetrische Substitution mit bindungsspezifischen Kationen läßt sich die bevorzugte Einpassung des Heteroringsystems in die Spezifitätstasche des Trypsins abschätzen.

Ist die kationische Flanke des Heteroringsystems nichtbindend (Im., Formam.) oder schlecht bindend (Gua.), der Phenylring aber mit einer gut bindenden Flanke (Am.) versehen, so hemmt die Substanz 2- 5-mal schlechter Trypsin als das Molekül mit gegenseitig ausgetauschten Substituenten <sup>22)</sup> (30,31;38,58;32,33).

Sind jeweils gleiche Reste mit einem Benzamidin (Typ F) oder einem amidinsubstituierten Heterozyklus (Typ E) verknüpft, so hat immer der Inhibitor von Typ E die besseren Antitrypsineigenschaften (209,224,127,207).

Es ist also wahrscheinlich, daß der Typ A, wenn er mit zwei Amidingruppen substituiert ist, mit dem Heteroringsystem und nicht dem Phenylrest in die Substrattasche eingelagert wird.

Kationische Substituenten am nichteingelagerten Molekülteil haben dann keinen großen Einfluß mehr (27,30,33,197): Der Austausch der 4'-Amidinogruppe gegen eine Imidazolinygruppe bringt nur eine 2- 3-fache Verschlechterung mit sich (24,30;106,107;4,113). Amin (195,46,234), Guanidin (27) oder Formamidin (33,197) haben die gleiche Hemmstärke wie das entsprechende Amidin.

Der Amidinsubstituent im nicht eingelagerten Molekülteil kann sogar ohne wesentliche Wirkungseinbuße gegen Wasserstoff (45,192), Nitrogruppe (38), Carbonsäureester- (57), Amino- (46,47,195), Acetamino- (48,49), Hydroxy- (51) oder Methoxygruppe (52) ersetzt werden, wobei die folgende Unterteilung des Einflusses erkennbar ist:

Im.  $\leq$  Am.  $\sim$  Gua. = Guanylhyd., Formam.,  $-\text{NH}_2$ , H,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{COOC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{NHCOCH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ .

### 1.6.3.4. Typ A<sub>1</sub> in Tabelle 7

#### Substitution im annelierten Fünfring

Mit Ausnahme von 65, 66 mit einer nicht acylierten Aminogruppe haben alle 3-substituierten Verbindungen einen Nachteil gegenüber den Stammverbindungen 20 - 23, weil die Einpassung in die Substrattasche erschwert ist.

Die Substanzen 75 und 76 sind als in 2-Stellung substituierte Derivate des 6-Amidinoindols aufzufassen.

Bei belegter 3-Stellung zeigen die 5-Amidinderivate die bessere Hemmung (62,66).

Die sterische Hinderung solcher 3-substituierter Moleküle (62, 66,63,82) wird noch größer, wenn zusätzlich das S-Heteroatom im Fünfring zur Sulfongruppe wird (67). Solche Moleküle werden wahrscheinlich nicht mehr in der Bindungstasche fixiert.

Auch mit zunehmender Größe des Substituenten am Indolstickstoff wird die Bindung in der Substrattasche erschwert (42,43,44).

Dagegen läßt sich die Substitution im nicht in der Substrattasche fixierten Phenylrest stark variieren.

Eine deutliche Verbesserung durch zusätzliche Methoxylgruppen (53-56) ist auch bei 96 zu beobachten und beruht auf Nebenvale-  
lenzbindungen, möglicherweise auf hydrophoben Bindungen.

### 1.6.3.5. Typ A<sub>2</sub> in Tabelle 8

Das Grundgerüst von 20 - 23 kann begrenzt variiert werden. Der isostere Austausch einer CH<sub>2</sub>-Gruppe im Fünfring des Indens 82 zum Benzofuran 79 ist möglich, ebenso der Austausch des 2-Phenylrings durch einen Thiophenring (84).

Das 5-Guanidinobenzimidazolderivat (87) wird dem Thionaphten 39 und dem Benzofuran 29 entsprechend schlechter gebunden als die Amidinverbindung 85. Wie bei 32 wird die aromatische Aminogruppe auch hier schlecht in der Substrattasche gebunden (88).

Ein Stickstoffatom des Benzimidazols läßt sich durch Schwefel ersetzen (94). Die Substitution einer Amidgruppe in 5-Stellung durch einen 5-Amidinobenzimidazolrest (92,93) bringt wie beim Indol (205) eine deutliche Verschlechterung.

Die Iminoeneinschiebung zwischen Heteroringsystem und Phenylring bei 85 - 94 ist Sauerstoff (89) und Schwefel (90,91) überlegen. Mit einem Sulfon in direkter Nachbarschaft zum Phenylrest fällt bei 91 die trypsinhemmende Wirkung noch mehr ab als bei den Verbindungen 64,109,146,174. Die schlechte Wirksamkeit der Sulfonylgruppe gegenüber einer Carbonylfunktion hat auch M a r k - w a r d t <sup>51)</sup> bestätigt.

#### 1.6.3.6. Typ B in Tabelle 9

Die Mehrzahl der Verbindungen des Typs B sind symmetrische Diamidine, bei denen der Ersatz einer der flankierenden Amidin- gruppen durch eine schlechter bindende kationische Flanke weniger Wirkungseinbuße bringt, als am Heteroringsystem des Typs A (103,104,113). Bis auf 126 sind alle Amidine mit einer Brücke Z bessere Hemmstoffe als das starre 4,4'-Diamidinodiphenyl (99).

Der isostere Austausch eines Stickstoffatoms in der Triazen- brücke des Berenils <sup>R</sup> (3) gegen -CH= bringt eine Verbesserung (106). Das Fixieren dieser Brücke mit einer -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Kette (121) oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Kette (122) liefert gleichwertige Verbindungen. Eine zusätzliche Phenoxyerweiterung verbessert die Trypsinhemmung von 127 nicht gegenüber 121.

Wird jedoch die aliphatische C<sub>5</sub>-Kette des Pentamidins <sup>R</sup> (4) durch einen Aromaten ersetzt, vervierfacht sich die Hemmstärke (116).

#### 1.6.3.7. Typ C in Tabelle 10

Das direkt verknüpfte 2,2'-Bisindol 129 ist ein mindestens 30-fach stärkerer Inhibitor als das Diphenyldiamidin 99 und kann als iminofixiertes Derivat von 170 betrachtet werden.

Vergleichbar mit Typ B bringt die Einführung einer Brücke zwischen die beiden Heteroringsysteme eine verstärkte Wirksamkeit mit sich.

Beim Benzimidazol (17) ist die optimale, hervorragende Hemmung schon bei einer  $-CH_2$ -Brücke erreicht <sup>22)</sup>. Die Verknüpfung über eine  $-CH=CH-$  oder  $-CH_2CH_2$ -Brücke gibt abgesehen von 154, 164 gute Hemmstoffe.

Während beim Indol eine hydrierte Brücke ähnlich dem Benzimidazol <sup>22)</sup> günstiger scheint, ist es beim Benzofuran unwichtig, ob die Brücke Doppelbindungen enthält oder gesättigt ist (137, 139, 148-151), wobei eine Verlängerung über vier Kohlenstoffatome hinaus keinen Vorteil mit sich bringt.

Die einer chemisch schwer realisierbaren  $-CH_2CH_2CH_2$ -Brücke isostere  $-CH_2CH_2-S$ -Brücke bei 144 erscheint ungünstig; bei der Oxidation des Thioäthers 144 zum Sulfoxid 145 ändert sich die Antitrypsinwirkung wie bei 62 und 63 kaum und fällt ab beim Sulfon 146.

Eine  $C_3$ -Kette mit sehr guter Eigenschaft stellt das Chalkon 147 dar. Die gleiche Brücke hat im Monoamidin 182 des Typs D keine besondere Wirksamkeit. Markwardt <sup>55)</sup> hat mehrere Diamidinchalkone und deren hydrierte Derivate getestet und unter ihnen viele gute Inhibitoren gefunden, wie z.B. 9 in Tabelle 5. Brückenglieder mit ein oder zwei Benzolringen 133, 134 oder mit einer  $-CH=CH-C_6H_4$ -Brücke 152 sind in diesem Substanztyp weniger geeignet als die einfache  $-CH=CH-$  oder  $-CH_2-CH_2$ -Ketten. Eine Ausnahme bildet die Imidazolgruppe der Benzofuranverbindungen 153.

Die Stellung der AmidinGruppe am Heterozyklus beeinflusst sehr empfindlich das Hemmverhalten der sehr schwer löslichen Thionaphtene.

Eine optimale Hemmung wird bei der unsymmetrischen 6,5'-Substitution 156 beobachtet. Dagegen sind von den Benzofuranen die 6,6'-substituierten Diamidine 140 und 141 nur geringfügig schlechter als die 5,6'-substituierten 137 und 139 und als die 5,5'-substituierten <sup>22)</sup>, was bei den hydrierten Brücken durchwegs deutlicher auffällt (139, 141).

Einen ähnlichen Unterschied zeigen die stellungsisomeren, hydrierten Indole 131 und 132, wobei gleichzeitig die immer wieder beobachtbare Vorrangigkeit des Indolrings zum Ausdruck kommt.

Ein derartiger Substituenteneinfluß ist auch bei den unsymmetrisch verbrückten Diamidinen 157 - 166 zu erkennen:

Die für das Benzofurangerüst ungünstige 6-Stellung der Amidin-Gruppe beeinträchtigt bei der ungesättigten  $-\text{CH}=\text{CH}-$ Brücke in 162 kaum die ideale 6-Amidinoindol-5-Amidinobenzofuran-Kombination von 159. Ist die Brücke jedoch hydriert, so unterscheiden sich die Wirksamkeiten um das 20-fache (164 und 19). Parallel dieser Trypsinwirkung geht die Hemmung von Faktor Xa, Thrombin und der PTT, nicht aber von Kallikrein <sup>22)61)</sup>.

#### 1.6.3.8. Typ D in Tabelle 11

Der Einschub einer  $-\text{CH}_2-$ Brücke im Typ A ändert im Thionaphten 167 die Hemmstärke kaum <sup>22)</sup>. Eine irgendwie geartete  $-\text{CO}-$ Gruppierung direkt am in der Substrattasche bindenden Ringsystem beeinträchtigt in allen Fällen die Hemmwirkung (168, 179, 204, 102, 209, 210, 211, 212, 215 und 224). Markwardt <sup>98)</sup> hat dann eine optimale Hemmung konstatiert, wenn die Carbonylgruppe drei Kohlenstoffatome vom bindenden Phenylring entfernt ist (147 und 9).

Der bindende Indolring wird von einer solchen Carbonylfunktion weniger beeinflusst (177, 211).

Der isostere Austausch einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe in der  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ Brücke von 171 gegen Sauerstoff (172) oder Schwefel (173) verursacht keinen Unterschied und der Wirkungsverlust bei Oxidation des Schwefelatoms zum Sulfon 174 entspricht dem Hemmverhalten von 64, 91 und 146.

Eine Verlängerung der ungesättigten oder hydrierten Brücke durchläuft in beiden Substanzklassen C und D bei 4 C-Atomen ein Maximum. Besonders herausragend ist in beiden Klassen die  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ Brücke.

Bei den aromatischen Brückengliedern ergeben sich größere Unterschiede zum Typ C, insofern als eine Phenoxyerweiterung durchwegs die Antitrypsinwirkung verdoppelt bei 193 und 195 - 197. Dabei erscheint die 3'- oder 4'-Stellung der Amidgruppe am Phenylring unerheblich bei 191 und 193, während sich die meta-Verknüpfung in 194 stärker auswirkt.

Eine Kombination von den zwei guten Brücken,  $C_2$ -Kette und Phenoxyerweiterung, sind in den Verbindungen 198, 199 und 201 verwirklicht. Die sehr guten Hemmwerte dieser Verbindungen sind besser als die entsprechenden Werte von Molekülen dieses Substanztyps, in denen das Brückenglied nur aus einer  $-CH=CH-$  (169,170) oder  $-C_6H_4-$ -Brücke (191,196) alleine besteht.

202 und 203 sind als Abkömmlinge des Berenil<sup>R</sup> (3) aufzufassen, bei denen ein Benzolring durch einen 2-Phenyl-benzofuran-Ringsystem ersetzt ist, was jedoch im Vergleich zu Berenil<sup>R</sup> keine besseren Hemmwerte liefert.

Die 2,5-verknüpften Bisindole 205 und 206 sowie auch 223 sind für eine Einlagerung in die Bindungstasche des Trypsinmoleküls weniger geeignet und nur dann gute Hemmstoffe, wenn der Phenylring mit einer Amidgruppe substituiert ist und sich einlagern kann (206).

#### 1.2.3.9. Typ E in Tabelle 12

Mit Ausnahme von 213 befinden sich in dieser Substanzklasse keine herausragenden Hemmstoffe. Mit der  $-CH=CH-$ -Brücke ist vermutlich noch kein Optimum erreicht (213 gegen 208). Eine Hydrierung der Brücke vermindert die Wirksamkeit in 214 stärker als bei Typ C und D. Die kurze analoge Verbindung 229 vom Substanztyp F fällt auch weit mehr ab gegenüber 208, als es dem sonstigen Bindungsunterschied von Benzolring und Heteroaromaten-Ringsystem entspricht. Die Nitroverbindung 222 kann mit 169 verglichen werden. Der 2-Carbonsäureäthylester des 6-Amidinoindols 215 ist als ringgeschlossenes Molekül genauso wirksam wie der 4-Amidinozimtsäureäthylester, aber dreimal weniger wirksam als 3-Amidinozimtsäureester<sup>99)</sup>.

### 1.6.3.10. Typ F in Tabelle 13

Von den allgemein mittelmäßigen Inhibitoren des Typs F heben sich nur drei Substanzen ab: Mit einer aliphatischen Seitenkette von 8 Kohlenstoffatomen ist der Abstand der beiden Amidin-<sup>R</sup>gruppen von 236 etwa so lang wie im Pentamidin<sup>R</sup> (4), die Hemmkonstante jedoch dreimal schlechter. Das in 7-Stellung mit einem 4-Amidinophenylrest substituierte  $\beta$ -Naphthamidin 242 hat eine einfach schlechtere Inhibitorkonstante als das von Markwardt getestete 6-substituierte Molekül 11<sup>56)</sup>.

Markwardt zeigte auch, daß die Benzylidenindandione 240 und 241 schlechter Trypsin hemmen, als die entsprechenden Benzyliden-Indanone<sup>99)</sup>. Über die geringe Wirksamkeit des 4-Amidinophenylamidins wurde auch berichtet<sup>100)</sup>.

### 1.6.4. Zusammenhang zwischen Trypsinhemmung und in vivo-Wirksamkeit gegen Trypanosoma brucei, rhodesiense <sup>a</sup>

Die rinderpathogenen Trypanosomenarten T.congolense und T. vivax unterscheiden sich als reine Plasmaparasiten von den menschenpathogenen T.rhodesiense, die sich außer in der Blutbahn auch in Gewebe und Körperflüssigkeit aufhalten<sup>23)</sup>.

Es ist bekannt, daß Substanzen, die gegen T.congolense und T. vivax wirken, auch gegen T.rhodesiense aktiv sind, nicht jedoch umgekehrt.

Mine<sup>101)</sup> konnte zeigen, daß zwischen der spezifischen und starken Anlagerung an Adenin-Thymin-reiche DNA und der Wirksamkeit gegen T.congolense eine gute Korrelation besteht.

Die A-T-Spezifität tritt bei Substanzen auf, die Amidin- oder Imidazoliny-Gruppen tragen. Bei T.rhodesiense-Infektionen sind die Imidazolinyverbindungen oft den entsprechenden Amidinderivaten unterlegen.

a Herrn Dr.Dr.Dr. E. Fink und Herrn Prof. Dr. J. Bafort habe ich sehr zu danken für die Überlassung der Ergebnisse ihrer Tierversuche.

Es ist daher wahrscheinlich, daß bei menschenpathogenen Trypanosomen neben der Anlagerung an Kinetoplasten-DNA ein zusätzlicher Wirkungsmechanismus von Bedeutung ist. Da Amidine, nicht aber Imidazolinylverbindungen, Proteinaseinhibitoren sind, könnten sie eine trypsinähnliche Proteinase der Gewebeparasiten hemmen. Die Tabelle 14 zeigt die Wirksamkeiten bei T.rhodesiense von Amidin- und von Imidazolinyl-Derivaten neben den KI-Werten der Diamidine bei Trypsin. (Imidazolinylderivate besitzen allgemein KI-Werte  $> 100 \mu\text{M}$ ).

Die Gegenüberstellung zeigt keine klare Parallelität zwischen Proteinasehemmung und Wirksamkeit gegen T.rhodesiense.

Die Verbindungen 130 und 193 verhalten sich anders als erwartet, indem die Imidazolinyl-Verbindung stärker trypanocid erscheint.

Bei 133, 3, 4, 159, 162 und 184 sind zwischen Amidin- und Imidazolinyl-Verbindungen keine Unterschiede festzustellen, während die restlichen acht Amidine 20, 23, 24, 119, 121, 190, 206 und 208 den entsprechenden Imidazolinyl-Verbindungen überlegen sind.

Eine direkte Korrelation zwischen KI-Wert und in vivo-Wirksamkeit ergibt sich ebenfalls nicht.

Tabelle 14

| A M I D I N -<br>Substituent |               |                    | IMIDAZOLINYL-<br>Substituent | Ref.<br>Am. | Ref.<br>Im. |
|------------------------------|---------------|--------------------|------------------------------|-------------|-------------|
| Nr.                          | KI ( $\mu$ M) | DEM <sup>a</sup>   | DEM <sup>a</sup>             |             |             |
| 3                            | 5,7           | 1-10 <sup>b</sup>  | 1                            | 66          | 102         |
| 4                            | 2,2           | 1-100 <sup>b</sup> | 10                           | 66          | 102         |
| 20                           | 2,0           | 1-10 <sup>b</sup>  | 10                           | 102         | 102         |
| 23                           | 4,9           | 1-10 <sup>b</sup>  | 10                           | 102         | 102         |
| 24                           | 5,8           | 0,5 <sup>b</sup>   | 10                           | 102         | 102         |
| 119                          | 2,1           | 1                  | 6                            | 103         | 103         |
| 121                          | 2,7           | 1                  | 50                           | 103         | 103         |
| 130                          | 1,4           | 1                  | 0,6                          | 103         | 103         |
| 133                          | 5,2           | 60                 | 50 <sup>b</sup>              | 103         | 103         |
| 159                          | 1,3           | 1                  | 1                            | 102         | 102         |
| 162                          | 2,0           | 1                  | 1                            | 102         | 102         |
| 179                          | 12            | 1                  | 1-10                         | 102         | 102         |
| 184                          | 4,7           | 0,5                | 0,5                          | 103         | 103         |
| 190                          | 1,3           | 3                  | 3                            | 103         | 103         |
| 193                          | 1,6           | 10 <sup>b</sup>    | 10 <sup>b</sup>              | 103         | 103         |
| 206                          | 2,0           | 1-3                | 3                            | 103         | 103         |
| 208                          | 15            | 10                 | 50                           | 102         | 102         |

a Dosis effectiva minima bei der Maus in mg/kg Körpergewicht.

b Dosis curativa minima bei der Maus in mg/kg Körpergewicht.

In Tabelle 15 sind alle Konstanten in Gruppen ihrer Wirksamkeiten aufgeteilt: Aus dieser Aufstellung ist erkennbar, daß die gegen T.rhodesiense sehr gut wirksamen Substanzen durchschnittlich eine bessere Inhibitor-konstante haben als die weniger aktiven, obwohl in jeder Wirksamkeitsgruppe gute Hemmsubstanzen zu finden sind. Gute Proteinaseinhibitoren, wie 199, 143 und 176, müssen keine ausgeprägte in vivo-Aktivität gegen T.rhodesiense haben.

Dagegen hat keine der gut trypanociden Substanzen eine schlechte Hemmkonstante.

Eine gute Anlagerung an A-T-reiche DNA nebst guter Proteinasehemmung scheint einen wesentlichen Einfluß auf die trypanocide Stärke der Diamidine zu haben. Eine proteinasehemmende Eigenschaft für sich führt nicht zwangsläufig zu trypanocider in-vivo-Wirksamkeit. Ein Beispiel dafür sind die Monoamidine 51 und 52, die sich zwar spezifisch aber nicht stark an A-T-reiche DNA binden <sup>101)</sup> und ebenso wie 53 gut Trypsin hemmen, aber keinerlei Aktivität gegen T.congolense und auch T.rhodesiense besitzen.

Eine Amidinverbindung mit a) ausgeprägter Affinität und Spezifität zu A-T-reicher DNA und b) guter Proteinasehemmung entfaltet eine gute trypanocide Wirksamkeit.

Tabelle 15 Hemmkonstanten ( $\mu\text{M}$ ) in Wirksamkeitsgruppen 102,103)  
gegen T.rhodesiense geordnet

| 1 mg/kg<br>(a,b)                                                   |      | 1 mg/kg <sup>b</sup> |     | 1-10 mg/kg <sup>b</sup><br>1 mg/kg <sup>a</sup> |      | 1-10 mg/kg <sup>a</sup> |      | 10-100 mg/kg<br>(a,b) |      | unwirksam |     |  |
|--------------------------------------------------------------------|------|----------------------|-----|-------------------------------------------------|------|-------------------------|------|-----------------------|------|-----------|-----|--|
| Nr.                                                                | KI   | Nr.                  | KI  | Nr.                                             | KI   | Nr.                     | KI   | Nr.                   | KI   | Nr.       | KI  |  |
| 186                                                                | 0,65 | 55                   | 2,5 | 19                                              | 0,60 | 156                     | 0,55 | 199                   | 0,56 | 53        | 1,2 |  |
| 157                                                                | 1,0  | 183                  | 4,3 | 161                                             | 0,84 | 147                     | 0,76 | 143                   | 0,67 | 167       | 1,2 |  |
| 106                                                                | 1,8  | 27                   | 5,1 | 159                                             | 1,3  | 76                      | 1,7  | 176                   | 0,74 | 52        | 3,2 |  |
| 170                                                                | 2,8  |                      |     | 190                                             | 1,3  | 75                      | 1,8  | 202                   | 2,8  | 45        | 3,9 |  |
| 200                                                                | 2,9  |                      |     | 130                                             | 1,4  | 66                      | 1,8  | 48                    | 3,2  | 51        | 5,2 |  |
| 24                                                                 | 5,8  |                      |     | 191                                             | 1,6  | 65                      | 2,0  | 171                   | 3,3  | 43        | 5,9 |  |
|                                                                    |      |                      |     | 196                                             | 2,5  | 206                     | 2,0  | 173                   | 3,7  | 168       | 8,0 |  |
|                                                                    |      |                      |     | 197                                             | 2,5  | 82                      | 2,1  | 46                    | 3,8  | 44        | 18  |  |
|                                                                    |      |                      |     | 169                                             | 3,1  | 219                     | 2,1  | 175                   | 4,0  |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 86                                              | 4,8  | 4                       | 2,2  | 172                   | 4,5  |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 23                                              | 4,9  | 213                     | 3,6  | 70                    | 6,3  |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 33                                              | 5,1  | 79                      | 5,1  | 117                   | 8,9  |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 94                                              | 5,1  | 125                     | 6,9  | 108                   | 9,0  |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 113                                             | 5,6  | 120                     | 8,0  | 174                   | 11   |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 107                                             | 6,0  | 71                      | 11   | 35                    | 15   |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 237                                             | 7,2  | 83                      | 11   | 23                    | 30   |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 118                                             | 7,4  | 95                      | 13   | 69                    | 29   |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 59                                              | 8,8  | 208                     | 15   | 73                    | 37   |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 72                                              | 9,2  | 73                      | 17   | 25                    | 74   |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 60                                              | 11   | 217                     | 23   |                       |      |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 30                                              | 12   | 68                      | 25   |                       |      |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 176                                             | 12   | 98                      | 33   |                       |      |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 97                                              | 20   | 77                      | 38   |                       |      |           |     |  |
|                                                                    |      |                      |     | 236                                             | 21   |                         |      |                       |      |           |     |  |
| 30                                                                 | 27   |                      |     |                                                 |      |                         |      |                       |      |           |     |  |
| Durchschnittswert aller Hemmkonstanten für jede Wirksamkeitsgruppe |      |                      |     |                                                 |      |                         |      |                       |      |           |     |  |
| 2,5                                                                |      | 4,0                  |     | 6,6                                             |      | 9,8                     |      | 13,4                  |      | 5,8       |     |  |

a Dosis effectiva minima bei der Maus in mg/kg Körpergewicht.

b Dosis curativa minima bei der Maus in mg/Körpergewicht.

## 1.7. Angaben zur Bestimmung von Hemmkonstanten

### 1.7.1. Wahl des Testsystems

Das für die Ermittlung der Hemmkonstanten benützte Testsystem lehnt sich an das Verfahren von G e r a t z <sup>58)</sup> an. Die Enzymaktivität wird durch Spaltung des synthetischen Substrats N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid bei 37°C gemessen. Das freigesetzte p-Nitroanilin wird spektralphotometrisch bei 405 nm in einer Schichtdicke von einem Zentimeter bestimmt.

Für eine Inhibitionsbestimmung werden bei zwei Substratkonzentrationen jeweils zehn Werte mit unterschiedlichem Inhibitorgehalt ermittelt, von denen mindestens zwei als Leerwerte eingesetzt werden. Inhibitorkonzentration und Enzymrestaktivität müssen in linearer Abhängigkeit stehen <sup>104)</sup>.

Die Kehrwerte der Reaktionsgeschwindigkeiten,  $\Delta E/\text{Min}$ , (Ordinate) werden gegen die Inhibitorkonzentrationen (Abszisse) aufgetragen. Die Geraden durch die Meßpunkte der beiden Substratkonzentrationen schneiden sich im linken, oberen Quadrat des Koordinatensystems. Die dem Schnittpunkt entsprechende Inhibitorkonzentration auf der Abszisse ist der negative Zahlenwert der Inhibitorkonstante.

#### 1.7.1.1. Meßansatz für Trypsininhibitoren

Meßstrahlung: 405 nm.

Schichtdicke: 1 cm.

Testvolumen: 3,0 ml.

Testtemperatur: 37°C,

Messung gegen Luft.

Tabelle 15

## A wasserlösliche Inhibitoren

| Meßansatz                                                                                                                             |              | Vergleich | Konz. im Test          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|------------------------|
| Inhibitor<br>(in H <sub>2</sub> O)                                                                                                    | a (0-0,5) ml | -         |                        |
| Puffer                                                                                                                                | 1,9 - a ml   | 1,9 ml    | 0,126-0,093 M          |
| Enzym                                                                                                                                 | 0,1 ml       | 0,1 ml    | 2 µg/ml                |
| Fünf Minuten bei 37°C vorinkubieren                                                                                                   |              |           |                        |
| Substrat                                                                                                                              | 1,0 ml       | 1,0 ml    | 1 X 10 <sup>-3</sup> M |
| III o. IV                                                                                                                             |              |           | 3 X 10 <sup>-3</sup> M |
| Mit Plastikspatel umrühren, E <sub>1</sub> bei t <sub>0</sub> Min., E <sub>2</sub> bei t <sub>5</sub> Min. messen, ΔE/Min. ermitteln. |              |           |                        |

Tabelle 16

## B schwerlösliche Inhibitoren

| Meßansatz                                                                                                                             |              | Vergleich | Konz. im Test          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|------------------------|
| Inhibitor<br>(in DMSO)                                                                                                                | a (0-0,2) ml | -         | 6,7 %                  |
| DMSO                                                                                                                                  | 0,2 - a ml   | 0,2 ml    |                        |
| Puffer                                                                                                                                | 1,7 ml       | 1,7 ml    | 0,113 M                |
| Enzym                                                                                                                                 | 0,1 ml       | 0,1 ml    | 2 µg/ml                |
| Fünf Minuten bei 37°C vorinkubieren                                                                                                   |              |           |                        |
| Substrat                                                                                                                              | 1,0 ml       | 1,0 ml    | 1 X 10 <sup>-3</sup> M |
| III o. IV                                                                                                                             |              |           | 3 X 10 <sup>-3</sup> M |
| Mit Plastikspatel umrühren, E <sub>1</sub> bei t <sub>0</sub> Min., E <sub>2</sub> bei t <sub>5</sub> Min. messen, ΔE/Min. ermitteln. |              |           |                        |

### 1.7.2. Reale Hemmkurve von Trypsin

Die Hemmung der meisten Inhibitoren ist bis zum 100 %-Wert nicht linear proportional der Hemmstoffkonzentration (reale Hemmkurve). Die Bestimmung der Inhibitorkonstante muß in dem linearen Abschnitt vorgenommen werden. Um diesen Bereich festzulegen, wurde die Trypsinhemmung von Verbindung 23 in einem Konzentrationsbereich von  $1 \times 10^{-6}$  M -  $2 \times 10^{-4}$  M im Testansatz A bei  $1 \times 10^{-3}$  molarer Substratkonzentration bestimmt. Die Enzymrestaktivitäten in Prozent des ungehemmten Ansatzes, gegen den Inhibitorgehalt, halblogarithmisch aufgetragen, ergibt den realen Hemmverlauf (Abb. 4).

Die ideale Hemmkurve läuft, wie von F r i t z <sup>104)</sup> beschrieben, im Bereich 30-70 %iger Enzymaktivität. Die diesem Abschnitt entsprechenden Inhibitorkonzentrationen können zur KI-Messung eingesetzt werden.

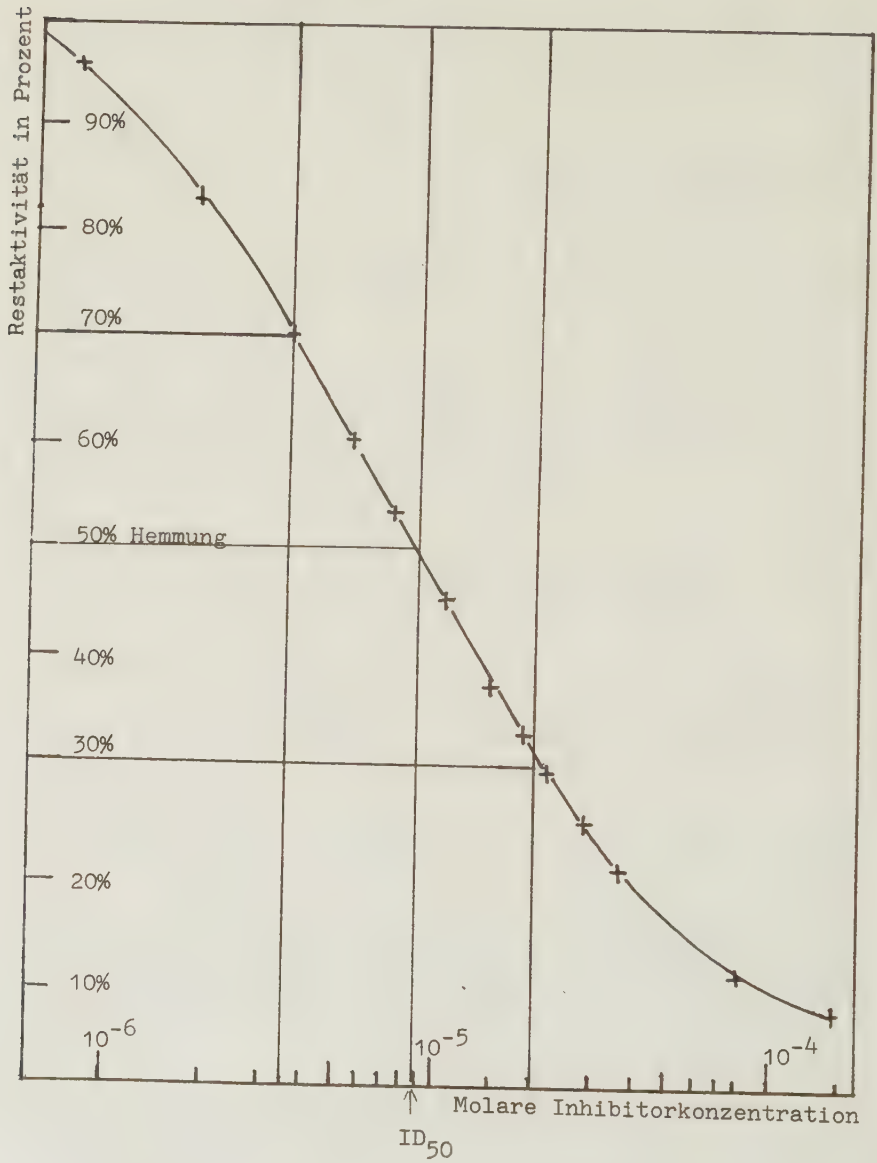
#### 1.7.2.1 Bestimmung der Inhibitorkonzentration für 30-70-prozentige Enzymhemmung und Ermittlung der ID<sub>50</sub>

In einer Vormessung mit  $10^{-3}$  molarer Substratkonzentration werden 0,01 ml, 0,1 ml und 0,5 ml einer etwa  $5 \times 10^{-5}$  molarer Inhibitorstammlösung neben einem Enzymleerwert eingesetzt und die Enzymrestaktivität ermittelt. Mit Hilfe der realen Hemmkurve läßt sich dann der Inhibitorbereich für den Test exakt bestimmen, auch wenn die Werte der Vormessung nicht im linearen Abschnitt liegen:

Auf einer verschiebbaren Schablone (z.B. Plastikfolie) mit dem logarithmischen Maßstab der Abszisse bringt man die Testkonzentration des eingesetzten Inhibitors auf der Höhe der entsprechenden Restaktivität (Ordinate) zum Schnittpunkt mit der realen Hemmkurve.

Der unter dem linearen Teil der Kurve liegenden Konzentrationsbereich kann in den Test eingesetzt werden. Die Inhibitormenge, die im Test mit  $10^{-3}$  molarer Substratkonzentration 50 Prozent des Enzyms hemmt, kann direkt abgelesen

Abbildung 4    Reale Hemmkurve von Trypsin mit Inhibitor 23  
(102/198), DAPI



werden. Diese Inhibitortestkonzentration wird als  $ID_{50}$ -Wert bezeichnet.

Bei einem Vergleich zwischen diesem Wert und der nach Dixon bestimmten Inhibitorkonstante ergab sich bei 20 Verbindungen ein Faktor für  $KI/ID_{50}$  von 0,57 (Variationskoeffizient: 22 %). Die im Text mit b) gekennzeichneten Ergebnisse sind mit diesem Faktor multiplizierte  $ID_{50}$ -Werte. Diese Umrechnung wurde bei Verbindungen benutzt, die

- 1) als schlechte Hemmstoffe in hoher Konzentration eingesetzt werden müssen, die
- 2) durch hohe Eigenfärbung den Test stören und die
- 3) keine lineare Kinetik haben.

### 1.7.3. Auswertung der Meßergebnisse

Die graphische Auswertung der zwanzig Meßpunkte erfolgt manuell oder durch einen Computer mit angeschlossenem Schreiber <sup>a</sup>.

Die Abbildung 5 zeigt repräsentativ das computergezeichnete Dixonplot der kompetitiven, linearen Hemmung von Substanz 199.

Alle Verbindungen, die nicht besonders mit c) oder d) gekennzeichnet sind, haben ein solches Hemmbild.

Die "degressive" Hemmung von 133 ist in Abbildung 6 zu sehen. Ähnlich verhielt sich auch 41 und 74.

Auch bei Variationen von Enzym- oder Substratkonzentration (z. B. 1,5 mM anstatt 3 mM) blieben diese Substanzen "irregulär".

Die Abbildung 7 zeigt die "progressive Hemmung" von 152, wie sie auch bei den Substanzen 161, 164 und 198 abgeschwächt auftrat.

a Herrn Prof. P. Nickel, Freie Universität Berlin, danke ich sehr herzlich für die Erstellung des Computerprogramms.

Abbildung 5

Dixon-Auswertung der KI-Bestimmung von Trypsin und 199

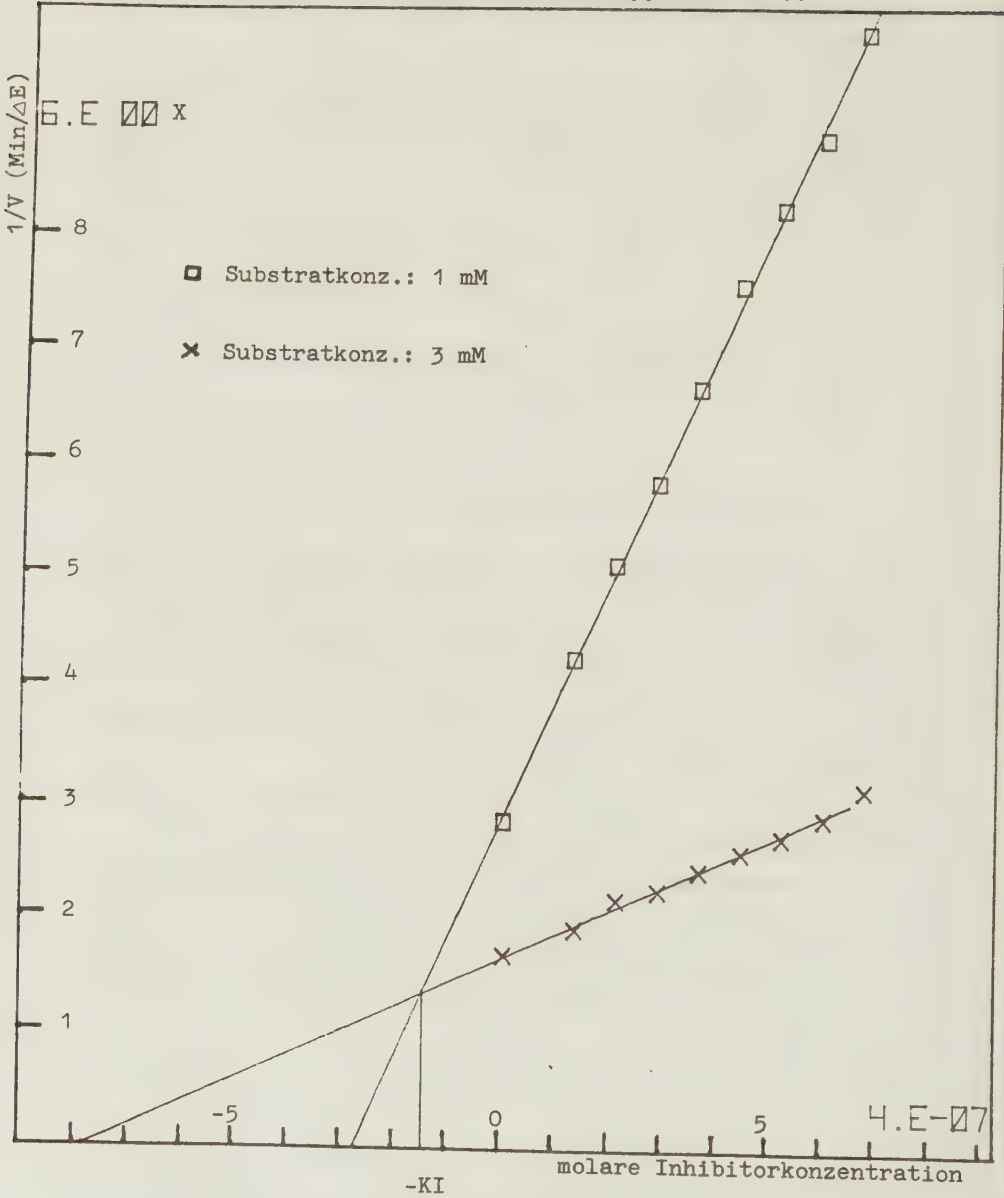


Abbildung 6

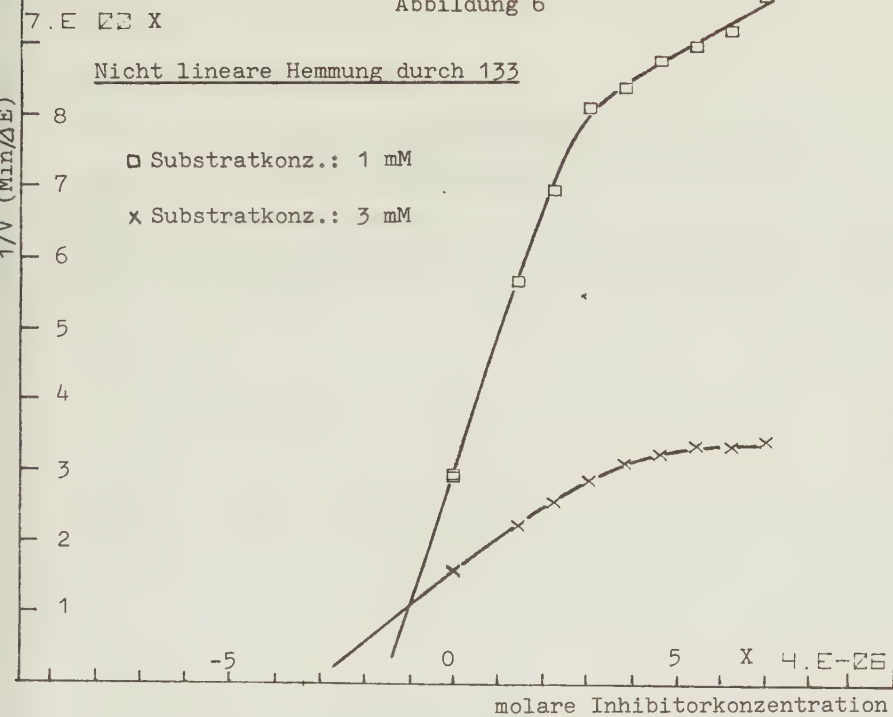
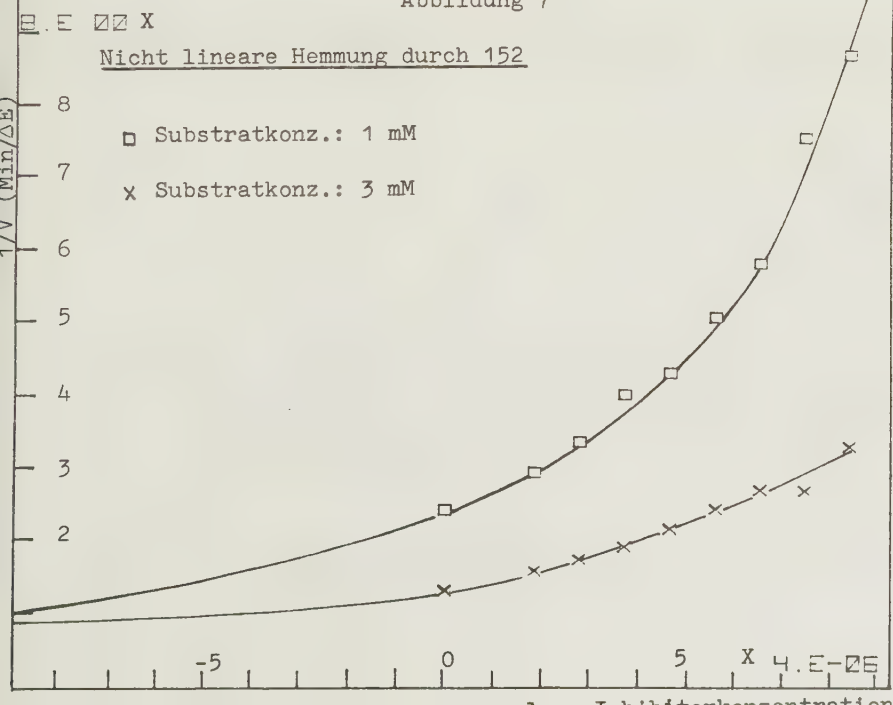


Abbildung 7



#### 1.7.4. Linearität im Meßansatz

Im Testansatz A, mit 1 mM Substratkonzentration, wurden steigende Mengen Trypsin eingesetzt und gegen die Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Bei fünf Minuten Inkubationszeit sind die Werte  $\Delta E/\text{Min.}$  von 0,011 - 0,163 (entsprechend 0,2 - 3  $\mu\text{g}$  Trypsin) linear.

#### 1.7.5. Einfluß von Dimethylsulfoxyd auf das Meßsystem

Da viele Inhibitoren in Wasser nicht genügend lösbar sind, müssen sie in einem anderen Milieu eingesetzt werden. Lösungsmittel, wie DMSO, können die Dissoziationskonstante eines Enzym-Inhibitor-Komplexes beeinträchtigen und müssen auf ihre Brauchbarkeit im Test untersucht werden.

##### 1.7.5.1. Beeinflussung der Enzymaktivität

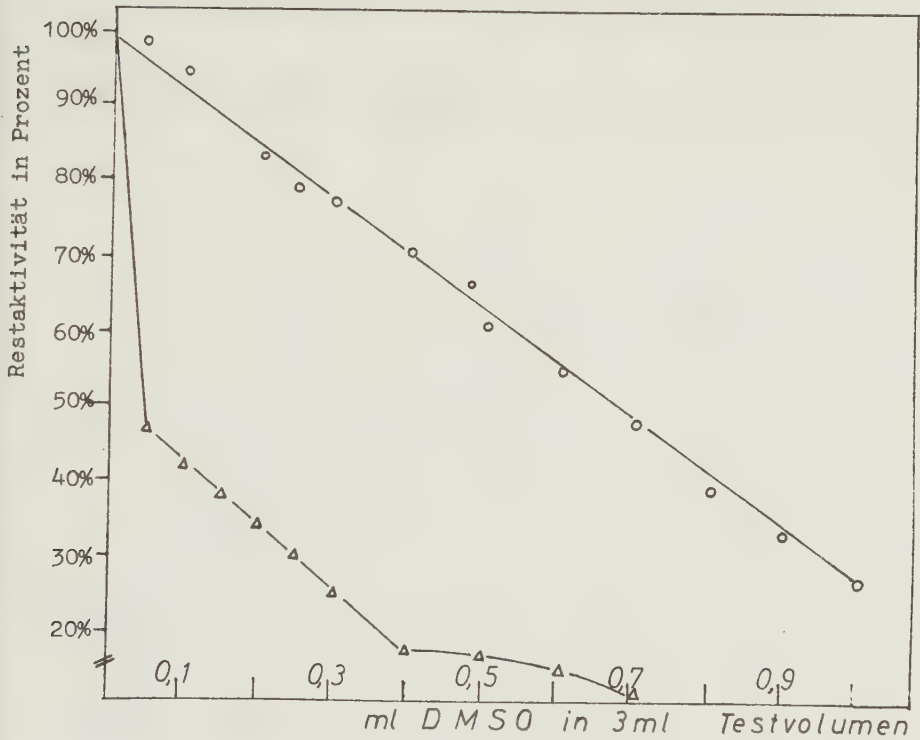
Bei  $10^{-3}$  molarer Substratkonzentration wurde die Hemmung von Trypsin durch steigende Mengen DMSO in den beiden Testsystemen I und II untersucht:

Tabelle 17

| I                 |              | II                |              |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| Trypsin           | 0,1 ml       | Trypsin           | 0,1 ml       |
| Puffer            | 0,9 - 1,9 ml | DMSO              | 0 - 1,0 ml   |
| DMSO              | 0 - 1,0 ml   | 5 Min. inkubieren |              |
| 5 Min. inkubieren |              | Puffer            | 0,9 - 1,9 ml |
| Substrat          | 1,0 ml       | Substrat          | 1,0 ml       |

Abbildung 8 zeigt die Desaktivierung in beiden Ansätzen. Bei einem Kontakt mit DMSO in verdünntem Puffermilieu (I) fällt die Enzymaktivität proportional, linear ab (0). Die Desakti-

Abbildung 8 Desaktivierung von Trypsin durch DMSO  
in zwei Testsystemen



vierung erfolgt erwartungsgemäß drastischer, wenn in hoher Konzentration mit DMSO 5 Minuten vorinkubiert wird ( $\Delta$ ). Ein DMSO-Gehalt von 6,7 % (entsprechend 0,2 ml) inaktiviert im Test I 15 % und im Test II 65 % des Enzyms.

### 1.7.5.2. Beeinflussung der Inhibitorkonstante durch DMSO

Die Hemmstärke einer  $3 \times 10^{-5}$  molaren Lösung von Verbindung 28 gegenüber Trypsin wird bei drei Substratkonzentrationen in vier Testansätzen bestimmt, die unterschiedliche Konzentrationen an DMSO enthalten.

Die Zahlen in der Tabelle 18 geben die Enzymhemmung in Prozent an, bezogen auf den ungehemmten Ansatz (0 %) im gleichen Testmilieu.

Tabelle 18

| Substrat-Testkonz.<br>(M) | Hemmung von 28 bei einer DMSO-Konzentration von: |       |       |      |
|---------------------------|--------------------------------------------------|-------|-------|------|
|                           | 0 %                                              | 3,3 % | 6,6 % | 10 % |
| $3,8 \times 10^{-4}$      | 87 %                                             | 83 %  | 66 %  | 10 % |
| $1,0 \times 10^{-3}$      | 62 %                                             | 60 %  | 58 %  | 57 % |
| $3,0 \times 10^{-3}$      | 48 %                                             | 41 %  |       | 44 % |

Ebenso wie die Aktivität nimmt die Hemmbarkeit von Trypsin mit zunehmender DMSO-Konzentration ab. Mit steigender Substratkonzentration wird dieser Einfluß geringer.

Um die Veränderung des KI-Werts durch DMSO zu beurteilen, wurden mehrere Substanzen in den beiden Testansätzen A und B gemessen und verglichen.

In Tabelle 19 sind die Werte gegenübergestellt; KI-Werte in ( $\mu\text{M/L}$ ) in Testsystemen A und B ermittelt.

Alle in DMSO-Milieu bestimmten KI-Werte sind schlechter als die im Testsystem A ermittelten Konstanten. Die im Text mit a) gekennzeichneten Substanzen sind im Testsystem B mit DMSO ermittelt. Wenn sie mit anderen Werten verglichen werden sollen, können sie mit dem empirischen Faktor 0,8 multipliziert werden.

Tabelle 19

| Substanz | KI in DMSO<br>( $\mu\text{M}$ ) | KI in Wasser<br>( $\mu\text{M}$ ) | $\frac{\text{KI Wasser}}{\text{KI DMSO}}$ |
|----------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| 53       | 1,2                             | 1,1                               | 0,92                                      |
| 24       | 8,3                             | 5,8                               | 0,70                                      |
| 63       | 6,1                             | 4,5                               | 0,74                                      |
| 148      | 1,7                             | 1,2                               | 0,71                                      |
| 149      | 1,2                             | 0,9                               | 0,75                                      |
| 190      | 1,6                             | 1,3                               | 0,81                                      |
|          |                                 |                                   | <u>0,77</u>                               |
|          |                                 |                                   | $\bar{x}$ 0,77                            |

#### 1.7.6. Fehler des Meßverfahrens

Der in Kapitel 1.6.1. angegebene Variationskoeffizient ist aus allen Mehrfachbestimmungen ermittelt.

Die in wässrigen Milieu mehrmals ermittelten Hemmkonstanten haben durchschnittlich einen Variationskoeffizienten von 14 %, die in DMSO bestimmten 9 % und die  $\text{ID}_{50}$ -Werte von nicht linearen Verbindungen 17 %.

Bei einer Einwaage von etwa 4 mg lag der Wägefehler bei 0,8 Prozent.

Durch unterschiedliche Auswertung, manuell oder mit Computer, ergaben sich Differenzen bis maximal 6 Prozent.

## 2. Nachweis und Charakterisierung enzymatischer Aktivitäten in Trypanosoma brucei, rhodesiense

### 2.1 Bekannte Enzyme der Gattung Trypanosoma

In den Mitochondrien, den Lysosomen und dem Cytosol der Trypanosomenzelle sind eine Großzahl von Enzymen lokalisiert. Bei der Suche nach definierten membrangebundenen oder löslichen Markerenzymen fanden O p p e r d o e s und B o r s t <sup>105)</sup> durch Differentialzentrifugation sieben glycolytische Enzyme im Rohextrakt von T.brucei,brucei. S t e i g e r und O p p e r d o e s wiesen in dieser Trypanosomengattung ebenso cytosollösliche Ribonucleasen, Acetylesterasen und lysosomale, saure Proteinasen nach <sup>106)</sup>.

Eine Thymidylatsynthetase untersuchten C h a l a b i und G u t t e r i d g e <sup>107)</sup> in mehreren Trypanosomenarten. In T.gambiense entdeckte W a l t e r <sup>108)</sup> eine Proteinkinase, die durch Nucleoside stimuliert und durch 3'-Desoxyadenosin gehemmt wird <sup>109)</sup>. M a r t i n et al. <sup>110)</sup> fanden im 15000 g-Sediment von T.brucei,brucei eine Adenylatcyclase.

Eine taxonomische Untersuchung verschiedener Trypanosomen gelang K i l g o u r und G o d f r e y <sup>111)</sup> anhand von Isoenzymen zweier Aminotransferasen.

In Trypanosoma cruzi, dem Erreger der südamerikanischen Chagas-Krankheit, fanden I t o und C a m a r g o <sup>112)</sup> proteolytisch aktive Substanzen. B o n g e r t z und H u n g e r e r <sup>113)</sup> isolierten und charakterisierten diese Proteinase, von der sie vermuten, daß sie bei der aktiven Penetration des Parasiten in die Wirtszelle eine Funktion hat. A v i l a et al. <sup>114)</sup> demonstrierten neben dieser Proteinase die Anwesenheit von zwölf sauren und vier neutralen Hydrolasen und eine alkalische Phosphatase.

Durch die Flagellumtasche, eine tiefe Einstülpung der Membran neben der Austrittsstelle des Flagellums, können bei T.brucei Makromoleküle durch Pinocytose aufgenommen werden <sup>115)</sup>. Viele

der oben genannten Enzyme sind in der Nähe dieser Tasche lokalisiert und bewirken die Verdauung der aufgenommenen Partikel 116) 117).

Ungeklärt erscheint bisher die Frage, ob Proteinasen durch die Tasche abgesondert werden können oder auf der Trypanosomenoberfläche lokalisiert sind.

Aus Kulturfiltraten von *Euglena gracilis*, einem chlorophyllhaltigen Protozon, konnten N a k a n o et al. eine solche extrazelluläre Proteinase isolieren und charakterisieren 118).

## 2.2. Eigene Untersuchungen

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden ausschließlich mit *Trypanosoma brucei*, *rhodesiense*, einem Laborstamm der Fa. Hoechst, durchgeführt, welche aus dem Blut infizierter Ratten gewonnen und chromatographisch von Blutbestandteilen gereinigt wurden.

Aktivitäts- und Hemmversuche sowohl mit intakten, als auch lytierten Trypanosomen und der Versuch einer teilweisen Reinigung des Enzymrohextrakts war das Ziel dieser Arbeit.

### 2.2.1. Enzymatische Aktivität und Hemmbarkeit intakter Trypanosomen

#### 2.2.1.1. Aktivität frisch isolierter, intakter Trypanosomen

Frisch isolierte Trypanosomen spalten die synthetischen Peptidsubstrate der Firma K a b i , L-Bapa und das natürliche Substrat Azocasein.

Im L-Bapa-Ansatz (Testbedingung s. Kapitel 4.2.4.1.) spalten  $10^{10}$  Trypanosomen, die 1 g feuchter Trypanosomen entsprechen 119), 0,16  $\mu\text{Mol}$  Substrat pro Minute, das sind 0,16 U/Gramm Trypanosomen. Die Trypanosomenmenge entspricht im gleichen Test 27  $\mu\text{g}$  Trypsin.

Wird die Trypanosomensuspension zweimal eingefroren und aufge-

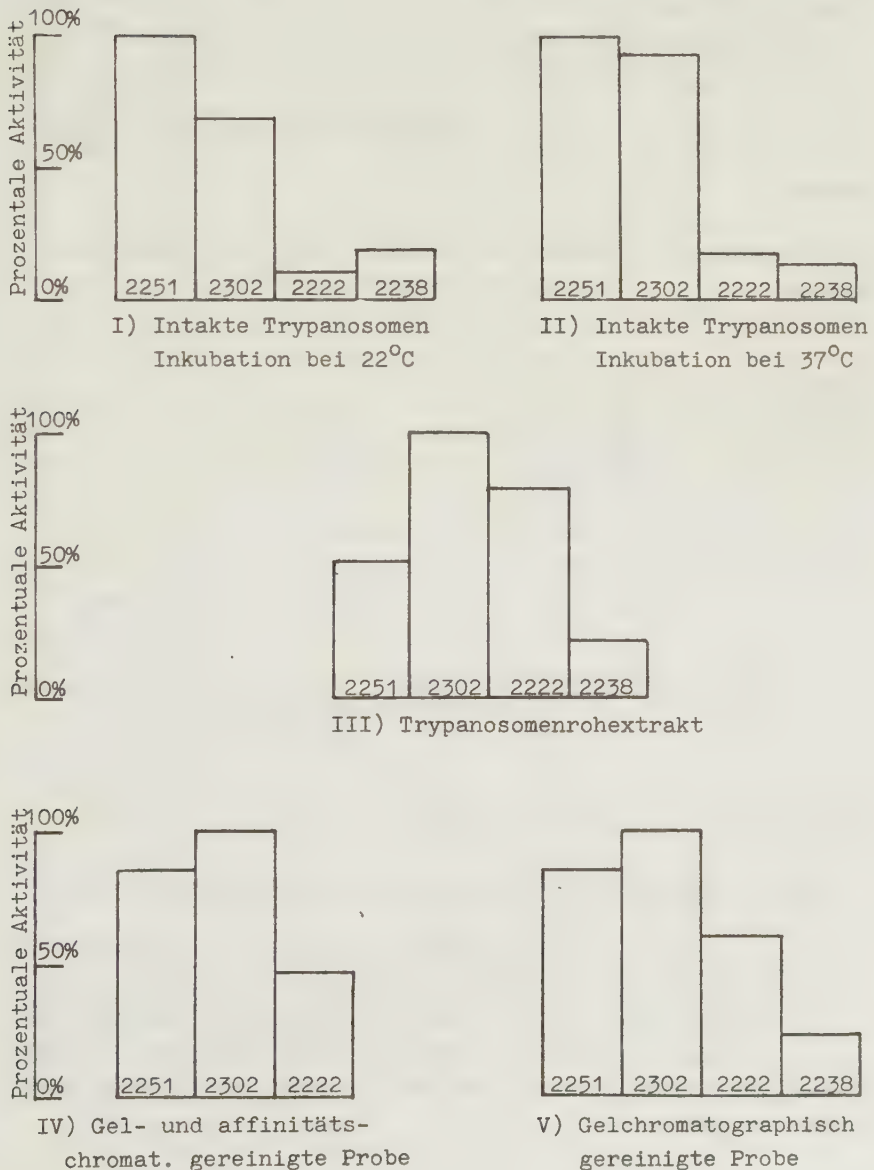
taut, erhöht sich die Aktivität um das Zehnfache auf  $1,9 \text{ U}/10^{10}$  Trypanosomen. Im Azocasintest (s. Kapitel 4.2.4.4.) entsprechen  $10^{10}$  intakter Trypanosomen nur einer Menge von  $11 \mu\text{g}$  Trypsin.

Werden lebendige Trypanosomen mit gleichen Konzentrationen verschiedener Peptidsubstrate inkubiert, ergeben sich recht unterschiedliche Spaltungsraten. Das Substrat S-2251, welches von Plasmin besonders gut gespalten wird, zeigt die höchste Umsatzrate (= 100 %). 21 mg Trypanosomen pro Test spalten dieses Substrat so, daß sich innerhalb von 40 Minuten eine Extinktionsdifferenz von 0,3 E ergibt (Testbedingung s. Kapitel 4.2.4.2.).

Die Abbildung 9 zeigt die prozentualen Spaltungsraten der K a - b i - Substrate (s. Formelübersicht 3) durch intakte Trypanosomen bei  $22^{\circ}\text{C}$  (I) und  $37^{\circ}\text{C}$  (II) Inkubationstemperatur im Gegensatz zu einem Trypanosomenrohextrakt (III), einer affinitätschromatisch gereinigten (IV) und gelchromatographisch gereinigten Probe (V). Die letzten Proben unterscheiden sich deutlich von I. Hier wird das Kallikreinsubstrat S-2302 besser gespalten. Nach 40-minütiger Inkubation bei  $22^{\circ}\text{C}$  waren noch etwa 80 Prozent der Trypanosomen beweglich, wohingegen bei  $37^{\circ}\text{C}$  50 Prozent unbeweglich geworden waren.

Die festgestellten Aktivitäten bei  $37^{\circ}\text{C}$  gleichen zunehmend den Spaltungsraten des Rohextrakts, was schließen läßt, daß wohl durch Abtötung zusätzliche Proteinaseen freigesetzt werden.

Abbildung 9 Prozentuale Spaltungsraten durch verschiedene Trypanosomenproben der K a b i - Substrate S-2251 (Plasmin) S-2302 (Plasma Kallikrein), S-2222 (Trypsin) und S-2238 (Thrombin)

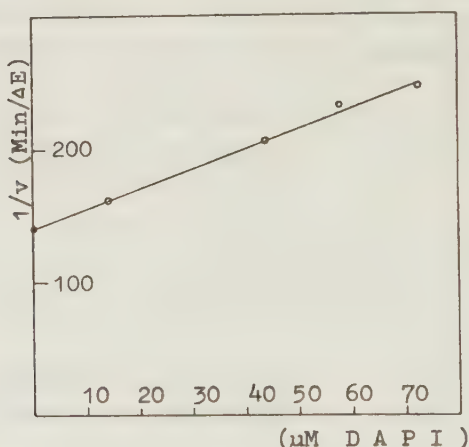


### 2.2.1.2. Beeinflussung durch Inhibitoren

Die proteolytische Aktivität lebender Trypanosomen läßt sich durch synthetische und natürliche Inhibitoren hemmen. Die Spaltung des Substrats S-2251 durch 20 mg Trypanosomen wird von jeweils 130 µg/ml des Trasylols<sup>R</sup> zu 60 %, des Sojabohnen-Trypsininhibitors zu 40 % und des Antipains zu 100 % gehemmt.

Auch die Diamidine haben eine inhibitorische Eigenschaft. Die Abbildung 10 zeigt den Einfluß unterschiedlicher DAPI-Konzentrationen auf die Spaltung von S-2251 durch lebendige Trypanosomen.

Abbildung 10      Hemmung der Substratspaltung (S-2251) in-  
takter Trypanosomen durch DAPI



### 2.2.2. Enzymatische Aktivität von Trypanosomen-Waschwasser

Mit einer PM-10-Membran angereicherter Glukose-Phosphatpuffer, in welchem frisch isolierte Trypanosomen über Nacht vorsichtig bewegt und anschließend abzentrifugiert worden waren, zeigte eine geringe Aktivität gegenüber den Kabisubstraten, mit einem ähnlichen Spaltungsmuster wie die intakten Trypanosomen (I in Abbildung 9).

Die enzymatische Spaltung war aber zu gering (0,024 E/10 Min), um Inhibitionsversuche zu unternehmen.

Nach einer Aufbewahrung des angereicherten Puffers im Eisbad über Nacht war keine Aktivität mehr nachweisbar.

### 2.2.3. Charakterisierung des Trypanosomenrohextrakts

#### 2.2.3.1. Lysieren der Trypanosomen

Die Herstellung eines Trypanosomenrohextrakts aus frischen Trypanosomen durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen der Probe in destilliertem Wasser genügte nicht den Anforderungen, da das Zentrifugat dieses Aufschlusses nur minimale Azocaseinspaltung entfaltete. Das Sediment der Zentrifugation enthielt noch etwa 50 % intakte und 10 % bewegliche Trypanosomen.

Eine Wiederholung der Lyse mit 0,1 prozentiger Triton-X-Lösung brachte eine zusätzliche L-Bapa-Aktivität aber wiederum nur geringe Azocaseinspaltung. Erst ein Aufschluß mit 0,1 prozentiger Triton-X-Lösung oder  $10^{-3}$  molarer HCl mit zusätzlicher, kurzer Ultraschallbehandlung zerstörte die Zellstrukturen vollständig und lieferte ein Material, welches Azocasein spaltete. Andere Detergentien, wie Sarkosylsulfat oder Dodecylsulfat zerstörten jede Aktivität.

In Tabelle 20 sind die aufeinanderfolgenden Lysierungsmethoden von 3,5 Gramm tiefgefrorener Trypanosomen mit den resultierenden Aktivitäten angegeben.

Die azocaseinspaltende Proteinase scheint stark membrangebunden zu sein, wohingegen die L-Bapa-Aktivität auch im Cytosol lokalisiert ist.

Aus einem Gramm, also  $10^{10}$ , Trypanosomen wurden durchschnittlich 40 mg Protein gewonnen (Bestimmungsmethode s. Kapitel 4.2.19.). A v i l a et al. <sup>114)</sup> ermittelten in kulturgezüchteten epimastigoten T.cruzi  $6,6 \times 10^{-3}$  mg Protein und  $9 \times 10^{-6}$  mg DNA pro  $10^6$  Zellen.

Tabelle 20

| 3,5 Gramm Trypanosomen                                                  | Aktivität pro g Trypanosomen |                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                                                         | U im L-Bapa-Ansatz           | $\hat{=}$ Menge ( $\mu$ g) Tryps. im Azocaseintest |
| 1) Lysiert durch H <sub>2</sub> O<br>Sediment/Zentrifugat →             | 0,41                         | 0,2                                                |
| 2) + 0,1 % Triton-X-<br>Sediment/Zentrifugat →                          | 0,18                         | 0,2                                                |
| 3) + 0,1 % Triton-X, Ultra-<br>schall<br>Sediment/Zentrifugat →         | 0,38                         | 1,7                                                |
| 4) + 10 <sup>-3</sup> m HCl<br>Sediment/Zentrifugat →                   | 0,39                         | 1,5                                                |
| 5) + 10 <sup>-3</sup> m HCl, Ultra-<br>schall<br>Sediment/Zentrifugat → | 0,39                         | 3,9                                                |

#### 2.2.3.2. Einfluß von Natriumazid auf die Enzymaktivität

Im mikroskopischen Bild der aufgeschlossenen Trypanosomen waren nach einigen Stunden Lagerung ein leichter Bakterienbefall festzustellen, der durch eine 0,002 proz. Natriumazidlösung verhindert wurde. Da Natriumazidkonzentrationen bis zu 1,3 Prozent die L-Bapa-Spaltung nicht beeinflusste, wurden frisch isolierte Trypanosomen vor dem Einfrieren immer mit 0,002 % Natriumazid versetzt.

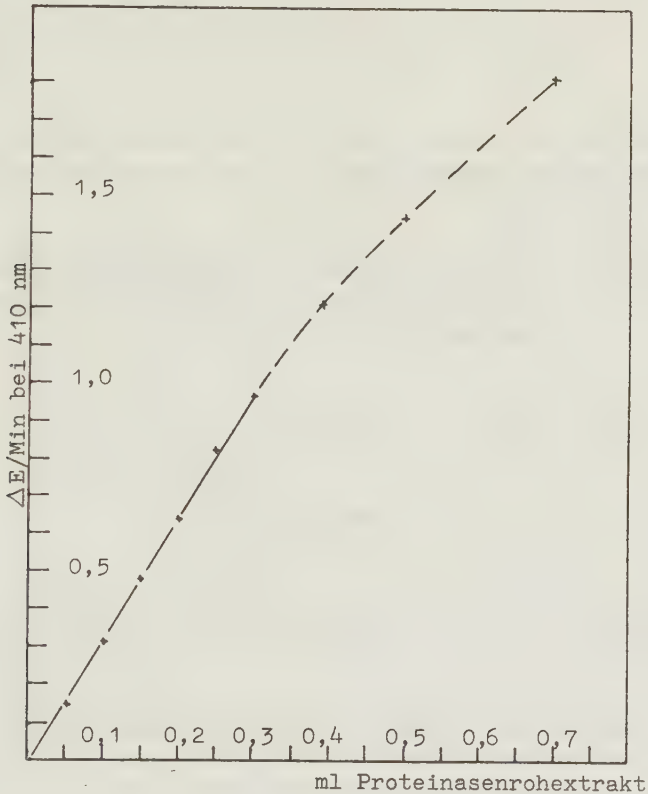
#### 2.2.3.3. Linearität im Testansatz

In dem in Kapitel 4.2.5.3. beschriebenen Testansatz zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit eine lineare Abhängigkeit von der Proteinase menge zwischen 0,015 - 0,10  $\Delta$ E/Min, entsprechend

5,5 mU - 33 mU. Die Extinktionsänderung bleibt länger als 15 Minuten konstant.

Die Linearität der L-Bapa-Spaltung ist in untenstehender Abbildung 11 gezeigt.

Abbildung 11 Linearität der L-Bapa-Spaltung durch Trypanosomenrohextrakt



### 2.2.3.4. Stabilität des Rohextrakts

Um die Haltbarkeit der Proteinase zu kontrollieren, wurde eine Probe im Eisbad bei 0°C aufbewahrt und 21 Tage lang auf ihre Restaktivität im L-Bapa-Ansatz hin untersucht. Die Aktivität fiel in dieser Zeit linear um 24 Prozent ab. Die Azocaseinspaltung fällt dagegen auch bei tiefgefrorener Lagerung bei -28°C merklicher ab.

### 2.2.3.5. Spaltungsspezifität gegenüber verschiedenen Substraten

Die durchschnittliche Aktivität des Trypanosomenrohextrakts, bezogen auf ein Gramm, gegenüber verschiedenen Substraten ist in untenstehender Tabelle angegeben.

Tabelle 21 Durchschnittliche Aktivität eines Rohextrakts aus einem Gramm Trypanosomen in verschiedenen Testansätzen

| Substrat             | Aktivität/g Tryp. ( $\hat{=}$ $\mu$ g Trypsin im gleichen Test)                                 | Testansatz<br>s. Kapitel |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| L-Bapa <sup>a)</sup> | 1,4 U ( $\hat{=}$ 204 $\mu$ g Trypsin)<br>1,6 U ( $\hat{=}$ 270 $\mu$ g Trypsin)<br>1,4 - 1,9 U | 4.2.5.3.                 |
| L-BAEE               | 1,6 U ( $\hat{=}$ 60 $\mu$ g Trypsin)                                                           | 4.2.5.4.                 |
| S-2251               | 0,59 U                                                                                          | 4.2.5.5.                 |
| S-2222               | 0,38 U                                                                                          | 4.2.5.5.                 |
| S-2302               | 0,73 U                                                                                          | 4.2.5.5.                 |
| S-2238               | 0,13 U                                                                                          | 4.2.5.5.                 |
| Azocasein            | ( $\hat{=}$ 7-13 $\mu$ g Trypsin)                                                               | 4.2.5.5.                 |

a Die Aktivität von 1 g frischer, intakter Trypanosomen betrug 0,16 U.

### 2.2.3.6. Einfluß zweiwertiger Kationen und Kaliumcyanid auf die Aktivität des Rohextrakts

In dem in Kapitel 4.2.6. beschriebenen Testansatz werden die zweiwertigen Metalle Calcium, Mangan, Magnesium, Kupfer, Kobalt und Zink neben Kaliumcyanid in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem Rohextrakt inkubiert und die Restaktivität gegenüber dem kationenfreien Ansatz (= 100 %) bestimmt. In untenstehender Tabelle sind die Aktivitäten in unterschiedlichen Testsystemen angegeben.

Tabelle 22

Einfluß zweiwertiger Metalle und Kaliumcyanid auf die Aktivität des Rohextrakts in unterschiedlichen Testsystemen

| Substrat               | Restaktivität bei Zusatz von: |                  |                  |                  |                  |                  |                  |     |
|------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----|
|                        | ---                           | Ca <sup>2+</sup> | Mn <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | Cu <sup>2+</sup> | Co <sup>2+</sup> | Zn <sup>2+</sup> | KCN |
| Azocasein <sup>a</sup> | 100                           | 116              | 131              | 61               | 18               | 28               | 0                | 154 |
| L-Bapa <sup>b</sup>    | 100                           | 100              | 105              | 105              | 22               | 35               | 0                | 150 |
| S-2251 <sup>c</sup>    | 100                           | 98               | 85               |                  |                  |                  | 35 <sup>d</sup>  | 147 |
| S-2302 <sup>c</sup>    | 100                           | 90               | 92               |                  |                  |                  | 49 <sup>d</sup>  | 130 |
| S-2266 <sup>c</sup>    | 100                           | 135              | 95               |                  |                  |                  | 56 <sup>d</sup>  | 133 |
| S-2238 <sup>c</sup>    | 100                           | 116              | 100              |                  |                  |                  | 75 <sup>d</sup>  | 113 |
| S-2222                 | 100                           | 135              | 185              |                  |                  |                  | 90 <sup>d</sup>  | 100 |

a Hemmstoffkonzentration 1,4 mM; b Hemmstoffkonzentration 1,0 mM;  
c Hemmstoffkonzentration 0,5 mM; d Hemmstoffkonzentration 0,05 mM.

Auffallend ist die durchwegs starke Desaktivierung in allen Testsystemen durch Zink; Kobalt und Kupfer erweisen sich ebenso als Inhibitoren, was im Verein mit der Aktivierung durch KCN für reaktive -SH-Gruppen spricht. Calcium aktiviert nur

wenig die Umsatzraten der Substrate S-2266 und S-2222. Ein Komplexbildner, wie Äthylendiamintetraessigsäure (5 mM), kann die L-Bapa-Spaltung nicht hemmen.

#### 2.2.3.7. Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die Aktivität des Rohextrakts

Zur Charakterisierung des Proteinasegemisches wurden reversible und irreversible, spezifische und unspezifische Inhibitoren herangezogen. Die Hemmprozente der unterschiedlichen Inhibitoren (ungehemmter Ansatz = 0 %) in Testsystemen mit verschiedenen Substraten sind in Tabelle 23 angegeben. Die Hemmansätze sind in Kapitel 4.2.7. aufgeführt.

Als sehr starker Inhibitor erweist sich erwartungsgemäß das Thiolreagenz p-Chloromercuribenzoat (p-CMB). Die elektrophilen Chloromethylketone TLCK und TPCK (s. Formelschema 4) sind ebenso stark wirksam, wobei die Aminosäure Lysin günstiger erscheint. Besonders tritt dies bei der Umsetzung des Substrats S-2222 hervor.

Auch der irreversible Serinproteinasehemmstoff DIFP entfaltet die größte Wirkung bei diesem Substrat.

Die Hemmversuche intakter Trypanosomen mit Substrat 2251 (s. Kapitel 2.2.1.2.) lassen sich mit diesen Werten vergleichen (doppelt umrandete Felder). Bezogen auf die hier eingesetzte Inhibitormenge wurden intakte Trypanosomen durch 102/198 zu 13 %, durch Trasylol<sup>R</sup> zu 23 % und Sojabohneninhibitor zu 15 % gehemmt. Die Diamidine (20, 23 und 24) konnten nicht in wesentlich höheren Konzentrationen mit dem Rohextrakt inkubiert werden, da in diesem Fall eine Trübung auftrat.

Im Azocaseintest entfalten steigende Mengen von 150/49 (Nr. 24), Trasylol<sup>R</sup> und Sojabohneninhibitor unterschiedliche Wirkungen. Aus dem Verlauf der Desaktivierung in Abbildung 12 ist die herausragende Wirksamkeit des Sojabohneninhibitors (STI) zu erkennen.

Tabelle 23 Einfluß einiger Inhibitoren auf die unterschiedlichen Aktivitäten des Rohextrakts

| Inhibitor             | Hemmung bei Substrat in Prozent<br>über der Inhibitorkonzentration |              |             |             |             |             |              |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
|                       | Azocasein                                                          | L-Bapa       | S-2251      | S-2302      | S-2266      | S-2238      | S-2222       |
| DIFP <sup>a</sup>     | 36<br>4mM                                                          | 22<br>0,5mM  | 78<br>0,5mM | 47<br>0,5mM | 58<br>0,5mM | 56<br>0,5mM | 100<br>0,5mM |
| TLCK <sup>a</sup>     | 35<br>1,4mM                                                        | 100<br>0,5mM | 98<br>0,5mM | 94<br>0,5mM | 92<br>0,5mM | 94<br>0,5mM | 60<br>0,5mM  |
| TPCK <sup>a</sup>     | 75<br>1,4mM                                                        | 75<br>0,5mM  | 84<br>0,5mM | 74<br>0,5mM | 87<br>0,5mM | 30<br>0,5mM | 0<br>0,5mM   |
| p-CMB <sup>b</sup>    | 93<br>3mM                                                          | 92<br>0,5mM  | 98<br>0,5mM | 94<br>0,5mM | 97<br>0,5mM | 0<br>0,5mM  | 40<br>0,5mM  |
| Antipain <sup>c</sup> | 79<br>0,3 µg                                                       | 43<br>0,1µg  | 0<br>0,1µg  | 8<br>0,1µg  | 16<br>0,1µg | 38<br>0,1µg | 50<br>0,1µg  |
| Trasylo <sup>c</sup>  | 0<br>14 µg                                                         | 9<br>0,1mg   | 17<br>50µg  | 16<br>50µg  | 11<br>50µg  | 30<br>50µg  | 40<br>50µg   |
| STI <sup>c,d</sup>    | 100<br>14 µg                                                       | 0<br>0,1mg   | 13<br>50µg  | 0<br>50µg   | 0<br>50µg   | 0<br>50µg   | 0<br>50µg    |
| 102/198 <sup>e</sup>  |                                                                    | 20<br>0,5mM  | 30<br>15µM  | 19<br>15µM  | 17<br>15µM  | 38<br>15µM  | 30<br>15µM   |
| 98/202 <sup>f</sup>   |                                                                    | 18<br>0,5mM  | 37<br>15µM  | 25<br>15µM  | 10<br>15µM  | 25<br>15µM  | 5<br>15µM    |
| 150/49 <sup>g</sup>   |                                                                    | 0<br>0,5mM   | 17<br>15µM  | 11<br>15µM  | 10<br>15µM  | 6<br>15µM   | 5<br>15µM    |

a DIFP, TLCK, TPCK s. Formelübersicht 4;

b p-CMB = p-Chloromercuribenzoat;

c Menge des Inhibitors pro ml Ansatz;

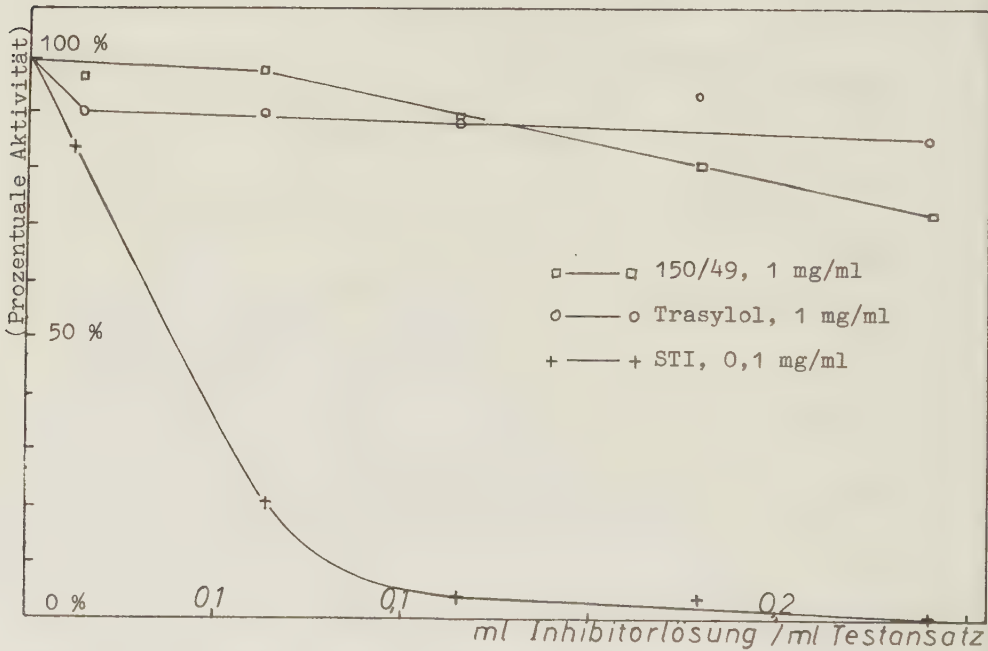
d STI=Sojabohnentrypsininhibitor;

e 102/198 = DAPI (Nr. 23), MG 350;

f 98/202 = Nr. 20;

g 150/49 = Nr. 24.

Abbildung 12 Hemmung der Azocaseinspaltung des Rohextrakts durch unterschiedliche Inhibitoren



Sojabohnentrypsininhibitor hemmt überraschend spezifisch die Azocaseinspaltung und schwächer bei 2251, wohingegen 150/49 nur eine geringfügige und Trasylol<sup>R</sup> gar keine Wirkung entfaltet (s. Tab. 23 und Abb. 12).

#### 2.2.3.8. Spaltung von p-Guanidinbenzoesäure-4'-nitrophenylester

Die Inkubation des Rohextrakts mit p-Guanidinbenzoesäure-4'-nitrophenylester (Nr. 6) als Substrat führte nach einer minima-

len Spontanspaltung zu einer streng linearen Hydrolyse ohne Anzeichen einer weiteren Desaktivierung. Ein Zusatz von DAPI führte zu gleichen Ergebnissen.

#### 2.2.3.9. PH- und Temperatur-Maxima unterschiedlicher Substratspaltungen durch Trypanosomenrohextrakt

Die Bestimmung der PH-Optima erfolgte mit den Puffern Citrat (PH 2-5), Phosphat (PH 5-8) und Tris (PH 8-9,75). Die Messungen wurden zweimal mit jeweils neu bereiteten Puffern wiederholt. Die L-Bapa-Spaltung wurde darüberhinaus mit einem Britton-Robinson Universalpuffer untersucht.

Die PH-Kurven des Kallikreinsubstrats 2302 und des Plasminsubstrats 2251 zeigten einen anderen Verlauf, wenn die Proteinase-lösung vorher 10 Min. mit Inhibitor inkubiert wurde (Abbildung 15 und 16). Das charakteristische Optimum bei PH 6,2 ist bei  $2 \times 10^{-5}$  molarer DAPI-Konzentration vollkommen verschwunden und bei Trasylol<sup>R</sup> (70 µg/ml) unterdrückt. Im Ansatz mit L-Bapa (s. Abb. 13) ist dieses Optimum nicht mehr klar zu erkennen.

Bei einer Inkubation mit DIPI, der entsprechenden Imidazolinylverbindung von DAPI, trat dieser Effekt nicht auf.

Während die Kabi-Substrate im neutralen Bereich optimal gespalten werden, liegen die Optima der Azocaseinspaltung im sauren und der L-Bapa-Spaltung im alkalischen Bereich.

Steiger und Opperoes fanden bei der Blutform von T.brucei mit H<sub>3</sub>-Acetylcasein als Substrat in 0,1 M Phosphat eine maximale Proteinaseaktivität bei PH 6,5. Weiterhin vermuten die Autoren, daß eine azocaseinspaltende "Saure Proteinase", die Venkatesan<sup>120)</sup> als kathepsin D-ähnliches Enzym mit einem PH-Optimum von PH 3,0 beschreibt, eine Thiolproteinase ist, da sie durch p-Chloromercuribenzoat stark gehemmt wird und ein PH-Optimum im neutraleren Bereich als PH 3,0 hat<sup>106)</sup>.

Die Temperaturoptima liegen beim Plasminsubstrat S-2251 bei 40°C, beim Kallikreinsubstrat S-2302 bei 45°C und beim Throm-

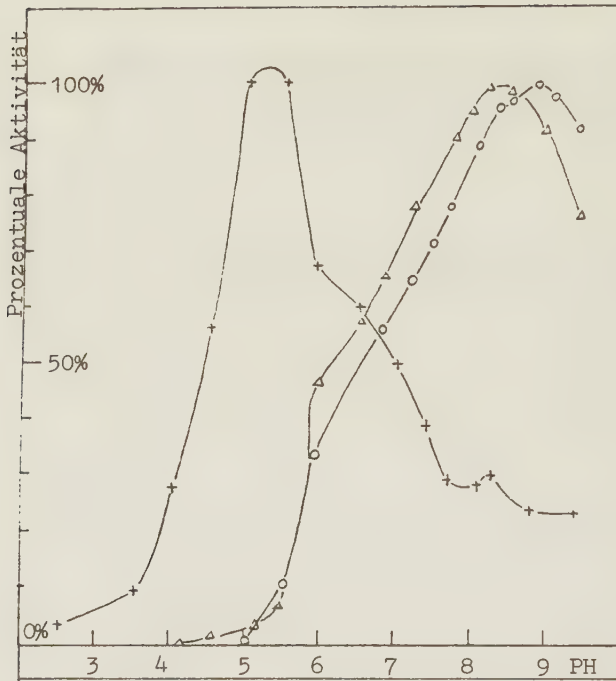


Abbildung 13

PH-Optima mit Substrat

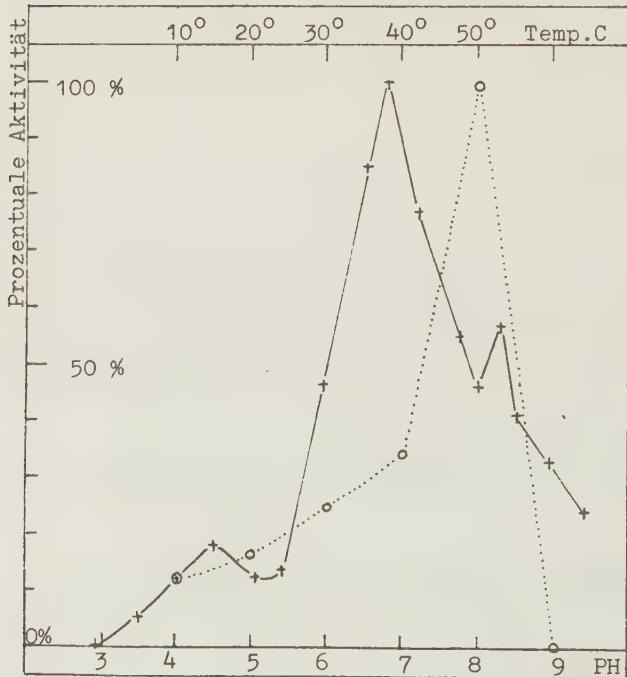


Abbildung 14

PH- und Temperatur-Optima  
mit Substrat S-2238

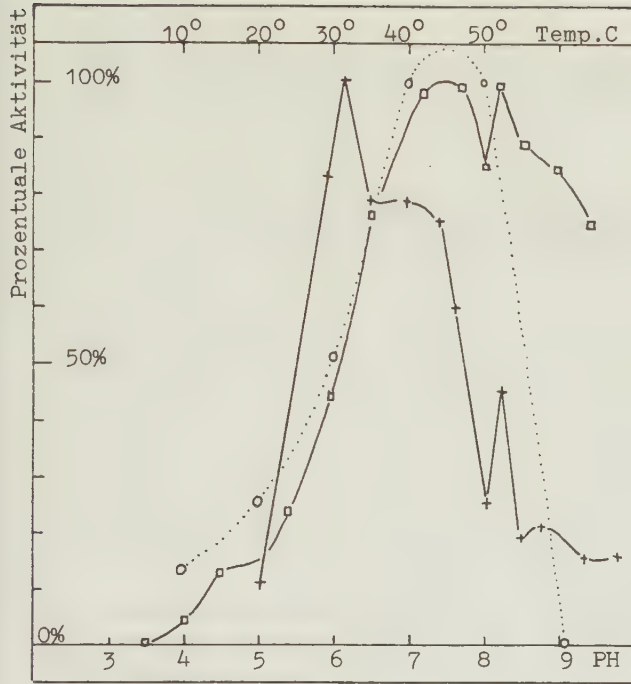


Abbildung 15

PH- und Temperatur-Optima  
mit Substrat S-2302

○·····○ Temperatur  
+——+ PH ohne Inhibitor  
□——□ PH mit DAPI

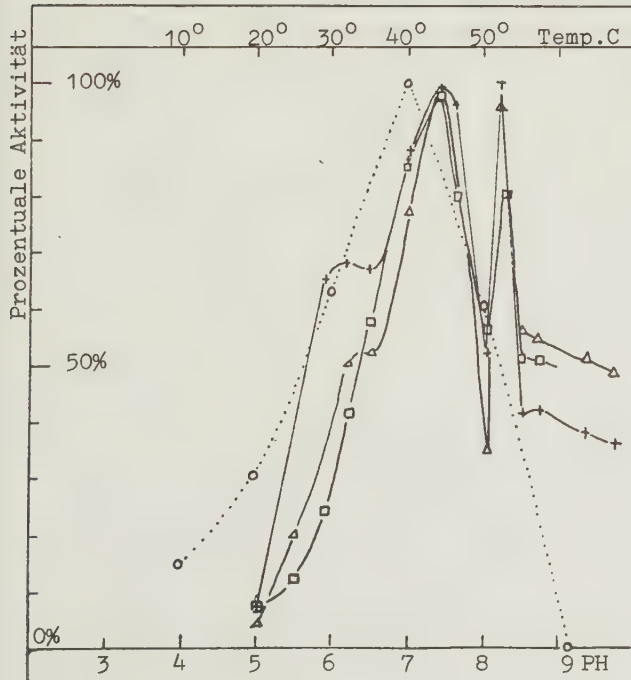


Abbildung 16

PH- und Temperatur-Optima  
mit Substrat S-2251

○·····○ Temperatur  
+——+ PH ohne Inhibitor  
□——□ PH mit DAPI  
△——△ PH mit Trasylol R

binsubstrat S-2238 bei 50°C. Ab 60°C waren bei keinem Substrat mehr Umsatzraten festzustellen.

#### 2.2.4. Reinigung des Trypanosomenrohextrakts durch Affinitätschromatographie

Die Vorversuche zeigten, daß mindestens eine der vorliegenden Proteinase durch kationische Inhibitoren gehemmt wird. Um eine solche, eventuell nur in geringen Mengen vorliegende, Proteinase aus dem proteolytischen Überschuß zu isolieren, bedarf es einer guten Trennungs- und Anreicherungsmethode. Beide Bedingungen erfüllt das Verfahren der Affinitätschromatographie. Vorversuche mit dem Rohextrakt ergaben, daß p-Aminobenzamidin, ein kompetitiver Trypsininhibitor, keinen Einfluß auf die proteolytische Aktivität von Trypanosomenproteinase hatte. Es überraschte daher auch nicht, daß dieses Molekül als Ligand der Affinitätschromatographie keine Enzyme des Rohextrakts kompetitiv binden konnte. Der proteolytische Anteil passierte die Säule und konnte nach einer Anreicherung durch eine Sephadex G 100-Säule in drei Fraktionen getrennt werden, von denen die erste die gesamte Aktivität beinhaltete. Die prozentualen Spaltungsraten gegenüber den K a b i - Substraten dieser Fraktion ist in Abbildung 9 unter V) aufgeführt.

Die in L-Bapa-Spaltung dieser Probe wurde durch je 13 µg/ml Antipain zu 100 % und überraschenderweise auch durch Sojabohnentrypsininhibitor zu 54 % gehemmt. Trasylol<sup>R</sup> und die Diamidine in  $2 \times 10^{-5}$  molarer Konzentration waren dagegen wirkungslos. Der von der Benzamidinsäule zurückgehaltene Anteil hatte keinerlei Aktivität und dessen UV-Maximum ließ erkennen, daß es sich zum Teil um DNA-Bestandteile handelte. Daraus ergab sich die Aufgabe, vor einer Proteinaseaufarbeitung die trypanosomale DNA möglichst rein abzutrennen.

Als Liganden für eine solche Affinitätschromatographie bieten sich Liganden an, die zwar eine Affinität zur polyanionischen DNA-Struktur, aber nicht zu Proteinase haben. Diese Eigenschaft zeichnet Imidazolinylverbindungen, wie Nr. 114, 138, 158 oder 163, aus. Im Anschluß an diese Reinigung sollte eine pro-

teinasenspezifische Chromatographie folgen, für die ein kationischer Ligand benötigt wird, der selektiv eine arginin/lysin-spezifische Proteinase bindet.

In Verfolgung dieser Aufgabe wurden mehrere Modellsubstanzen an Sepharose gekuppelt und ihre Chromatographieverhalten gegenüber DNA und Proteinase untersucht.

In Analogie zur bewährten Carbodiimidkupplung von p-Aminobenzamidin auf Sepharose, bieten sich auch hier Moleküle mit einer freien Aminogruppe an. In Formelschema 5 sind die Strukturformeln der verwendeten Substanzen angegeben:

#### Formelübersicht 5

#### Liganden<sup>a</sup> für die Affinitätschromatographie

|  |          |          |
|--|----------|----------|
|  | I) R =   | II) R =  |
|  | III) R = | 46) R =  |
|  | IV) R =  | 195) R = |

Da die Chromatographie bei Gelingen in einem Schritt über zwei hintereinander gekoppelte Säulen erfolgen sollte, um eine zwischenzeitliche Dialyse zu ersparen, mußte die Adsorption von DNA und Proteinase an den jeweiligen Liganden im gleichen Puffer gelingen.

a Für die freundliche Überlassung der Substanzen danke ich Herrn Dr. J. Ruff, Herrn R. Schlee und Herrn R. Holzheid.

In Modellversuchen mit Trypsin und DNA aus *Bacillus subtilis*<sup>a</sup> erwies sich die Aminobenzimidazolinyilverbindung I als bester Ligand der Sepharose (Imidazolinbenzsepharose) für eine DNA-Abtrennung.

Größere Moleküle, wie III und IV, führten zu einer gleichzeitigen Wechselwirkung mit Trypsin. III bildete mit den Polyanionen derart starke Komplexe, daß die DNA denaturierte und mit dem Gel verklumpte.

Als Liganden für eine Proteinasenchromatographie standen mit 46 und 195 zwei Moleküle zur Verfügung, die eine 30- bzw. 50-fach bessere Inhibitorkonstante mit Trypsin haben, als das mit vielfachem Erfolg angewandte p-Aminobenzamidin (II).

Auch hier war das große Molekül (195) wegen seiner ausgezeichneten zu starken Bindung unvorteilhaft, da eine Ablösung des gebundenen Trypsins ohne Aktivitätseinbuße nicht möglich war.

Ferner wirft die Herstellung des Affinitätsmaterials mit zunehmender Molekülgröße Probleme auf, da nichtgebundener Anteil sich nur sehr schwer mit 2 M Guanidinlösung oder  $10^{-3}$  molarer HCl auswaschen läßt.

Zur Trypsinbindung wurde daher Indolverbindung 46 mit gutem Erfolg eingesetzt. Mit dem Indolliganden 46 an Sepharose (Amidinindolsepharose) konnte mehr als die doppelte Menge Trypsin gebunden werden, als mit dem Benzolmolekül II (Amidinbenzsepharose), bezogen auf ein Gramm Naßgewicht des Säulenmaterials).

Das gilt aber nur bei einer Chromatographie mit Phosphatpuffer bei PH 6,0. In einem Tris-Puffer mit PH 8,0 war die Benzamidinsäule dagegen vielfach überlegen.

Der PH 6-Phosphatpuffer erwies sich für beide Systeme als gut geeignet: Aus einem Gemisch von DNA und Trypsin wird von der ersten Säule mit dem Ligand I selektiv die DNA gebunden und das Trypsin erst auf der zweiten Säule mit Ligand 46 fixiert. Beide Bestandteile lassen sich durch 0,8 molare Perchloratio-

a Herrn G. Minet danke ich für die freundliche Überlassung der DNA.

nenkonzentration im gleichen Puffer oder durch eine PH-Verschiebung zum Säuren (bis PH 3) ablösen.

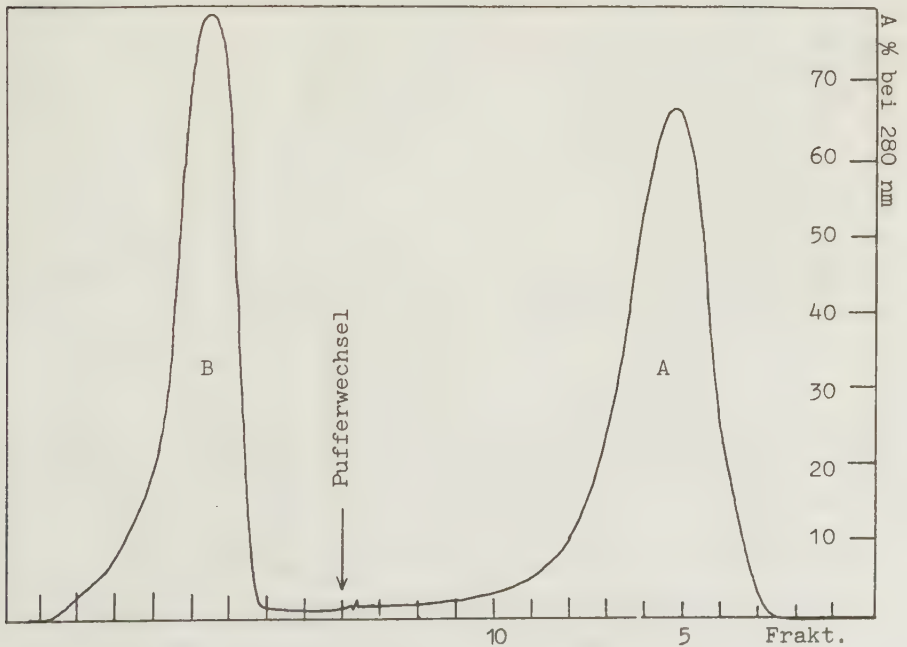
Als Nachteil des Systems erscheint die unbedingt erforderliche Abwesenheit von Äthylendiamintetraessigsäure, die bei vielen DNA-Präparationen zum Schutz vor Ribonucleasen in hoher Konzentration zugesetzt wird.

Als Vorteil steht die schnelle Abtrennung von nicht-proteolytischem Material (s. Abbildung 17) im Vordergrund.

Die Indolamidinsepharose mit 46 zeichnet sich durch starke Proteinasebindung aus, die besonders im leicht sauren Bereich der Amidinbenzsepharose mit II überlegen ist.

Abbildung 17

Reinigung des Rohextrakts über Imidazolinbenzsepharose

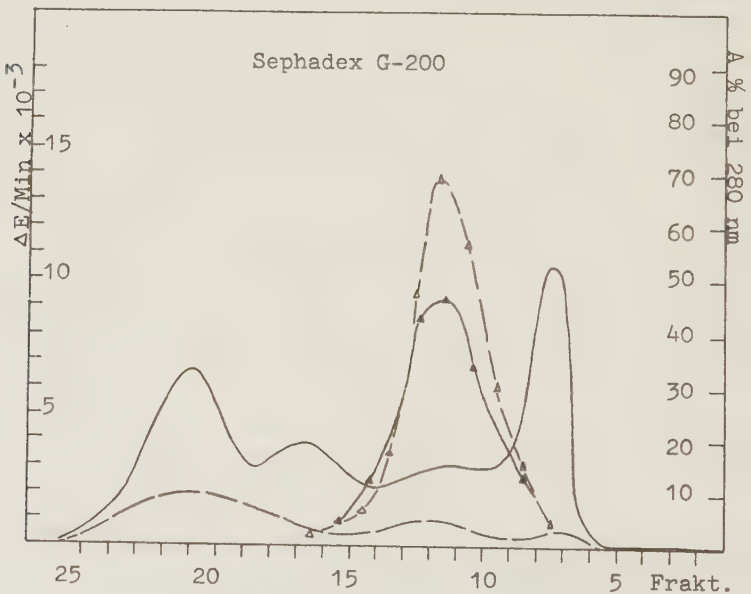


#### 2.2.4.1. Reinigung des Rohextrakts aus Trypanosoma rhodesiense

Der erste Auftrennungsschritt über die Imidazolinbenzsepharose erwies sich der Gelchromatographie überlegen, da durch hohe Flußraten ein schnelles Aufarbeiten großer Mengen Rohmaterial möglich war. In Abbildung 17 ist ein Diagramm dieser Chromatographie zu sehen. Der Durchlaufpeak A enthielt die gesamte Aktivität.

Einen Vergleich zwischen der angereicherten, aktiven Fraktion A aus Abbildung 17 und dem Rohextrakt gibt die Chromatographie beider Proben über Sephadex G-200 in Abbildung 18

Abbildung 18



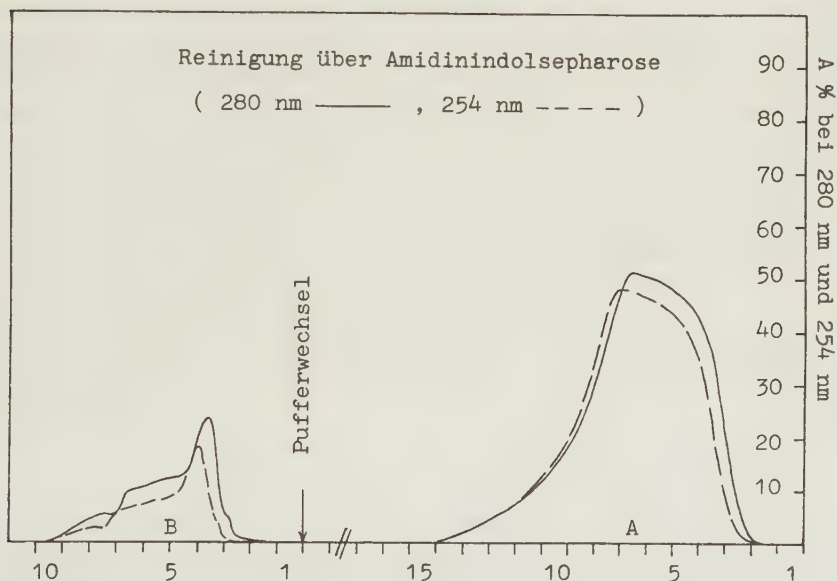
Rohextrakt: UV-Absorption ( — ), Aktivität ( $\blacktriangle \longrightarrow \blacktriangle$ ).

Rohextrakt einmal über Imidazolinbenzsepharose chromatographisch gereinigt: UV-Absorption ( --- ), Aktivität ( $\triangle \longrightarrow \triangle$ ).

Im Ausschlußvolumen ist noch ein schwacher Peak zu erkennen, der nach einer zweiten Chromatographie der Probe über Imidazolinbenz-sepharose verschwunden ist.

Die aktiven, angereicherten Fraktionen (A) der ersten Trennung (Abb. 17) werden weiterhin nicht über Sephadex G-200, sondern direkt über Amidinindolsepharose aufgetrennt (s. Abbildung 19).

Abbildung 19

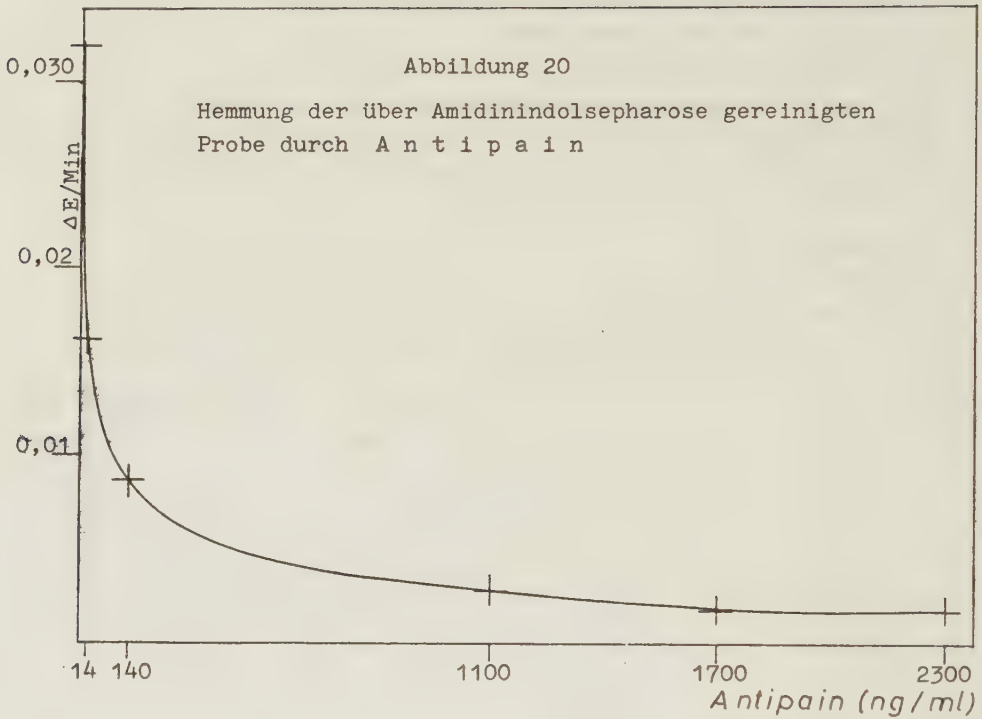


Der große, breite Durchlaufpeak A enthält keinerlei Aktivität. Durch Erhöhung der Ionenstärke (0,8 molare Perchlorat in Phosphat, PH 6,0) läßt sich der aktive Peak B ablösen, der wahrscheinlich noch mehrere Proteinasen enthält.

Die dialysierte Probe des Peaks B wird sehr stark durch Antipain gehemmt (Abbildung 20). Schon 14 ng/ml ( $2,3 \times 10^{-8}$  M) hemmen in diesem Ansatz 50 % der Aktivität.

Abbildung 20

Hemmung der über Amidinindolsepharose gereinigten  
Probe durch Antipain



In den Testansätzen mit den K a b i - Substraten wird besonders die Spaltung des Plasmin-Substrats durch Sojabohnentrypsininhibitor gehemmt.

Die weitere Auftrennung über Sephadex G-75 (s. Abbildung 22, oben) war unzureichend, zeigt aber deutlich drei bis vier Peaks, wobei die Hauptaktivität in der zweiten Schulter lokalisiert war. Diese Fraktion wurde zu Aktivitäts- und Hemmversuchen eingesetzt, da eine weitere Reinigung aus Materialmangel nicht sinnvoll war.

Die einzelnen Reinigungsschritte dieser und anderer Trennungsvorgänge wurden immer auf ihre Aktivität in unterschiedlichen Testsystemen (K a b i - Substrate und L-Bapa) untersucht nebst

den Inhibitoren DAPI, Antipain, Trasylol<sup>R</sup> und Sojabohnentrypsin-inhibitor.

Ein kombinierter Aktivitäts-/Hemmansatz diente der Einsparung teurer K a b i - Substrate: Nach kontinuierlicher Registrierung der Spaltungsraten über fünf bis zehn Minuten wird dem Test ein bestimmtes, möglichst kleines, Volumen Inhibitorlösung zugesetzt, kurz umgerührt und weitergemessen; nach Berücksichtigung des Volumenfehlers aus Anfangs- und Endvolumen ist die Desaktivierung direkt zu erkennen.

Bis hin zur letzten Probe, der Fraktion 8, hatten alle unterschiedlichen Aufarbeitungsstufen die gleichen prozentualen Spaltungsraten gegenüber den Substraten (s. IV in Abb. 9) und das gleiche Hemmbild in unterschiedlichen Testen (s. z.B. Abb. 21). Das läßt darauf schließen, daß es sich fortlaufend um die gleiche Proteinasenzusammensetzung handelt. Im letzten Test mit Fraktion 8 (s. Abb. 22) wurde deutlich die Spaltung des Plasminsubstrats 2251 durch DAPI am stärksten gehemmt. Genauso verhielt sich Sojabohnentrypsin-inhibitor.

Abb. 21      Kombinerter Aktivitäts- und Hemm-Ansatz mit ange-  
reichertem Peak B aus Abb. 19 im L-Bapa-Test

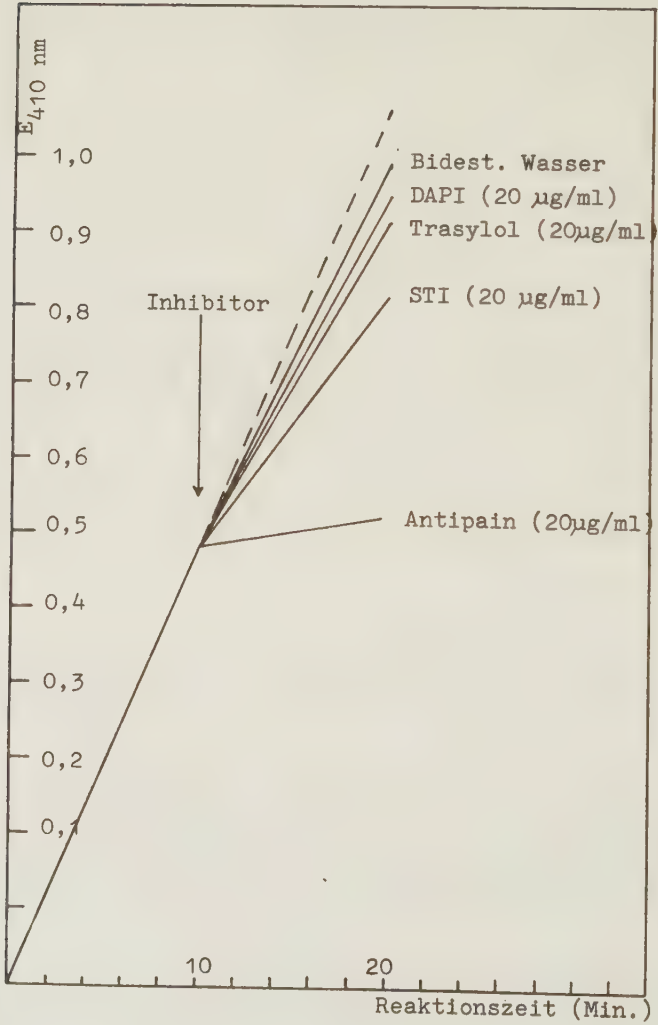
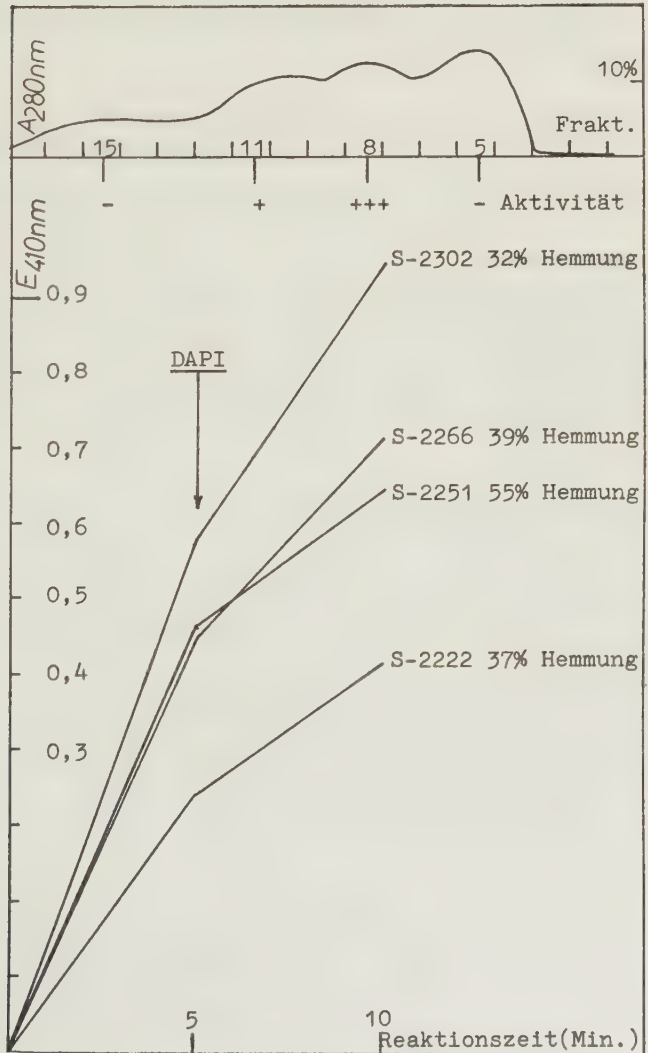


Abbildung 22 Chromatographie der angereicherten, dialysierten und aktiven Fraktion der Trennung über Amidinindolsepharose (oben); Aktivitäts-/Hemmansatz der aktiven Fraktion (+++) mit K a b i - Substraten und DAPI als Inhibitor (unten).

Sephadex G-75  
Chromatographie

Fraktion 8 im  
Aktivitäts-/  
Hemmansatz mit  
16  $\mu$ M DAPI als  
Inhibitor



In untenstehender Tabelle sind die spezifischen Aktivitäten gegenüber L-Bapa und den K a b i - Substraten der einzelnen Aufarbeitungsschritte angegeben. Der Zahlenwert in Klammern gibt den Anreicherungsfaktor an.

Tabelle 24

Anreicherung von Enzymaktivität aus Trypanosomenrohextrakt

Probe                      Spezifische Aktivität bei verschiedenen  
Substraten (mU/mg Protein)

| Probe                                           | L-Bapa       | S-2266       | S-2302       | S-2251       | S-2222       |
|-------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Rohextrakt                                      | 33           |              | 17,5         | 13,8         | 9,1          |
| Imidazolinbenz-<br>sepharose<br>Peak A, Abb. 17 | 26<br>(-)    | 37           | 33<br>(1,9)  | 23<br>(1,7)  | 18<br>(2)    |
| Sephadex-<br>G-200<br>Frak. 11, Abb.18          | 51<br>(1,5)  | 75<br>(2,0)  | 51<br>(1,5)  | 34<br>(1,5)  | 28<br>(1,6)  |
| Amidinindol-<br>sepharose<br>Peak B, Abb. 19    | 120<br>(2,4) | 160<br>(2,1) | 140<br>(2,7) | 100<br>(2,9) | 75<br>(2,7)  |
| Sephadex-<br>G-75<br>Frak. 8, Abb. 22           | 540<br>(4,5) | 430<br>(2,7) | 526<br>(3,8) | 430<br>(4,3) | 260<br>(3,5) |
| Anreicherung<br>gesamt                          | (16)         |              | (30)         | (31)         | (29)         |

Die Enzymaktivität gegenüber L-Bapa wurde 16-fach und gegenüber den K a b i - Substraten etwa 30-fach angereichert.

Alle inaktiven Fraktionen und Filtrate von Anreicherungen aus unterschiedlichen Reinigungsversuchen wurden auf inhibitorische

und aktivierende Eigenschaften gegenüber der Trypanosomenproteinasenase und Trypsin untersucht. Eine Streptokinaseaktivierung konnte nicht festgestellt werden. Eine niedermolekulare Fraktion der Sephadex-G-100-Trennung entfaltet gegenüber der Trypanosomen- und Trypsin-Aktivität eine Hemmeigenschaft, die mit zunehmender Menge aber geringer wurde. Ein solches Verhalten kann auf einer Hemmung und gleichzeitiger Trübung beruhen. Die Fraktion wurde nicht weiter untersucht.

## 2.2.5. Diskussion der Ergebnisse

Lebende Trypanosomen, *Trypanosoma rhodesiense*, entfalten Proteinaseaktivität, die sich vom Rohextrakt toter Trypanosomen unterscheidet. Das Plasminsubstrat S-2251 wird von lebenden Trypanosomen besser gespalten als die Kallikreinsubstrate S-2302 und S-2266. Im Ansatz mit dem optimalen Substrat S-2251 hemmen DAPI, Trasylol<sup>R</sup>, Sojabohnentrypsininhibitor und Antipain. Die L-Bapa-Spaltung läßt sich nur gut durch Antipain hemmen; alle anderen Inhibitoren hemmen auch in höheren Konzentrationen schlecht.

Das Penetrationsvermögen von *T. rhodesiense* im Darm der Tsetsefliege untersuchten Evans und Ellis<sup>121,122</sup>). Sie bestätigten einen aktiven Eintritt der Erreger in Darmzellen. Es ist daher wahrscheinlich, daß Trypanosomen ähnlich den Spermatozoen eine Proteinase für diesen Schritt besitzen. Um den eigenen Organismus vor Autolyse zu schützen, dürfte ein solches Enzym in aktiver Form nur in geringen Konzentrationen vorhanden sein und schnell deaktiviert werden. Die von Bongertz und Hungere<sup>113</sup>) aus *T. cruzi* isolierte Thiolproteinase vom Typ des Kathepsin B ist sehr labil und wird reversibel durch Sauerstoff inaktiviert.

Ein starker Inhibitor, wie Antipain, sollte die Funktion einer solchen "Oberflächenproteinase" ausschalten. In einem orientierenden Versuch konnten Trypanosomen, die mit Antipain inkubiert waren, eine Infektion und den Tod der Tiere nicht verhindern, wohl aber im Vergleich zur Kontrollgruppe um zwei Tage herauszögern.

Die Aktivitäts- und Hemmversuche mit dem Rohextrakt zeigte eine dominierende Thiolproteinase-Aktivität an.

Laughlin und Müller<sup>123)</sup> isolierten und charakterisierten aus dem Protozon *Tritrichomonas foetus* ein sehr ähnliches Enzym. Auch die Thiolproteinase aus *T. cruzi*<sup>113)</sup> und die extrazelluläre Thiolproteinase aus *Euglena gracilis*<sup>118)</sup> passen gut in dieses Schema.

Die von mir untersuchte Thiolproteinase-Aktivität wird wie das Thiolenzym Papain durch Antipain, TLCK, TPCK, p-Chloromercuribenzoat und die Kationen Zink, Kobalt und Kupfer gehemmt und durch Cyanid aktiviert. Es scheint mir möglich, daß eine solche Proteinase auch durch Arsengruppen beeinflußt wird, wie sie die altbekannten trypanociden Medikamente Atoxyl, Tryparsamid und Mel B enthalten.

Kathepsin B hat eine papainähnliche Charakteristik<sup>124)</sup>. Die lysosomale<sup>125)126)</sup> Thiolproteinase ist wahrscheinlich am katabolischen Gleichgewicht aktivierter Enzyme beteiligt.

Bei der intrazellulären Verdauung extrazellulärer, durch Endozytose aufgenommener, Proteine scheint das Kathepsin B ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen<sup>127)</sup>. Das Verdauungsenzym kann Kollagen und Gelatine spalten und ebenso Bakterienzellen lysieren<sup>128)</sup>. Synthetische Substrate werden optimal bei PH 6,0 gespalten<sup>129)</sup>. Ein kathepsin B-ähnliches Enzym in *T. rhodesiense* könnte ähnliche Funktionen erfüllen.

Boreham untersuchte den Zusammenhang zwischen fortschreitender Trypanosomeninfektion und einem 4- bis 5-fachen Anstieg von Kallikreinen im Blut und Urin<sup>130)-134)</sup> und vermehrtem Auftreten an Fibrinogen- und Fibrin-Abbauprodukten im Harn<sup>135) 136)</sup>.

Die gravierenden physiologischen Veränderungen führt der Autor auf eine Immunreaktion des befallenen Wirtsorganismus zurück. Das kininfreisetzende Enzym bewirkt einen starken arteriellen Blutdruckabfall, der durch Trasylol<sup>R</sup> (5000 IU), nicht aber durch Sojabohnentrypsininhibitor verhindert wird. Die Enzymaktivität wird durch Temperaturen über 60°C zerstört. Der Kininspiegel steigt auffallend an, wenn die Parasitämie zwischenzeit-

lich abklingt, was auf eine Immunantwort hindeutet. Es erscheint mir aber auch denkbar, daß durch vermehrte tote Trypanosomen intrazelluläre Proteinase freigesetzt werden.

Die beiden Kallikreinsubstrate S-2266 und S-2302 werden von meinem Rohextrakt aus Trypanosomen besonders gut gespalten. Thiolproteinase spalten bevorzugt Peptidbindungen, an denen die Aminosäuren Arginin, Lysin und Glycin beteiligt sind. Kathepsin B spaltet dann gut eine Peptidbindung, wenn in deren Nachbarschaft ein basisches Aminosäurepaar steht wie Arg-Arg, Arg-Lys oder Lys-Lys <sup>137)</sup>.

D e n k e r und F r i t z <sup>138)</sup> untersuchten die Rolle von Proteinase des Throphoblasten bei der Einleitung der Implantation des Embryos im Uterus und fanden eine maximale Enzymaktivität gegenüber dem Kallikrein-Substrat S-2266.

Die aus *T.cruzi* isolierte Proteinase spaltete selektiv von 39 Substraten aus einer und zwei Aminosäuren nur solche, bei denen die Carboxylgruppen von Arginin, Tryptophan oder  $\alpha$ -N-substituiertem Lysin beteiligt sind <sup>113)</sup>.

Mit fortschreitender Reinigung meines Rohextrakts aus Trypanosomen wird die Hemmwirkung von DAPI und STI besonders bei dem Plasminsubstrat 2251 zunehmend stärker. Plasmin spalten Fibrinpolymere zu niedermolekularen Bruchstücken. Solche Produkte fand B o r e h a m im Urin von Kaninchen am 7. Tag nach einer Infektion mit *T.rhodesiense* im Vergleich zu gesunden Tieren stark erhöht <sup>135) 136)</sup>.

## B Experimenteller Teil

### 3. Allgemeine Angaben über Materialien und Geräte

Alle Reagenzien wurden in p.a.-Qualität oder in der höchsten handelsüblichen Reinheitsform verwendet. Spezielle Substanzen sind mit Hersteller Nummer angegeben. Als Lösungsmittel diente zweifach destilliertes Wasser. Pufferlösungen wurden gegen zwei Standard-Puffer eingestellt.

Es wurden ausschließlich Reagiergefäße aus Kunststoff benutzt: 13 ml Polystyrol-Zentrifugenröhrchen und 100 ml Polypropylengefäße mit Schraubverschluß.

#### 3.1. Verwendete Geräte

Zeiss-Spektralphotometer DMR 21, Zeiss-Spektralphotometer PM 2K, beide mit thermostatisierbarem Küvettenhalter. Colora Ultrathermostat NB 32373, Bandelin Ultraschallbad Sonorex RK 255.

PH-Meter 28 der Firma Radiometer, Kopenhagen.

Tischrechner H.P. Calculator Mod. 9820 mit Plotter der Firma Hewlett-Packard GmbH, Frankfurt/a.M.

Hermle Kühlzentrifuge ZK-4 mit Rotor A.8.24 und A.6.14 der Firma Vetter K.G., St. Leon-Rot.

4 ml und 1,6 ml Kunststoffküvetten mit 10 mm Lichtweg, Rührspatel, Pipettenspitzen gelb und blau der Fa. Sarstedt, Nümbrecht.

Laborzentrifuge Piccolo, Heraeus Christ GmbH, Osterode/Harz. Thermostatisierbare Küvettenhalter<sup>a</sup>.

Ultra-Kryomat-TK-30, Firma Lauda.

Pipetten der Fa. Eppendorf, Hamburg. (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 und 1000 Mikroliter Festvolumen).

a Herrn Werkstattmeister W. Keller danke ich für die Anfertigung.

Gilson-Pipetman, variable Pipetten, C 200, C 1000, C 5000 und Pipettenspitzen C 5000 von der Fa. Abimed, Düsseldorf.

Fraktionssammler-Einheit, bestehend aus Combi Cold Rac II (LKB 2201), Peristaltikpumpe Varioperpex II (LKB 2120), Fraktionssammler Ultro Rac II (LKB 2070), UV-Photometer Uvicord III (LKB 2089) und Potentiometerschreiber (LKB 2210) der Firma L K B , Niederlassung München.

Chromatographiesäulen K 16/20, K 16/40, K 16/70, K 16/100 mit Kühlmantel und Adapter A/16, Vierwegeventil LV-4 von der Firma Deutsche Pharmacia Fine Chemicals, Niederlassung Freiburg. Glaschromatographierohre mit Kühlmantel (20 x 3,7 cm) angefertigt von der Fa. Laborcenter, Erlangen.

Amicon Ultrafiltrationszelle 8 - MC mit Diaflo Ultrafiltern PM 10, UM 05 und UM 10, Firma Amicon, Witten.

### 3.2. Verwendete spezielle Substanzen

Trypsin (vom Rind) krist. 3,5 U/mg, TPCK behandelt, Merck Art. Nr. 24579.

N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilidhydrochlorid (L-Bapa), Merck Art.Nr. 10754.

N- $\alpha$ -Benzoyl-L-argininäthylesterhydrochlorid (BAEE), Merck Art. Nr. 1672.

Alkoholdehydrogenase (ADH) Testkombination TBAB/15424, Fa. Boehringer, Mannheim.

Azocasein, rein, Art.Nr. 14390 der Fa. Serva, Heidelberg.

Substrate S-2222 (Art.Nr. 81/801/-340/0), S-2238 (Art.Nr. 81/801-352/0), S-2251 (Art.Nr. 81/801-357/0), S-2266 (Art.Nr. 81/801-354/0) und S-2302 (Art.Nr. 81/801-356-0) von der Fa. Deutsche Kabi, München.

Kabikinase, 3333 IE/mg, Art.Nr. 31/740-250, Fa. Deutsche Kabi, München.

CH-Sepharose 4B (Art.Nr. 2311), Sephadex-G-75 (Art.Nr. 2141),

Sephadex-G-100 (Art.Nr. 2151) und Sephadex-G-200 (Art.Nr. 2173) der Firma Deutsche Pharmacia, Freiburg.

Diäthylaminoäthylzellulose DE 52-Whatmann, vorgequollen, der Firma Vetter, St. Leon-Rot.

4-Guanidinbenzoesäure-4-nitrophenylesterhydrochlorid, Merck Art.Nr. 10562.

Trasylol<sup>R</sup> (6600 KIE/mg) Geschenk der Firma Bayer, Leverkusen.  
Antipain und Sojabohnentrypsininhibitor Geschenk von Herrn Prof. Dr. H. F r i t z , Institut für Klinische Chemie, München.

TPCK (Art.Nr. 17016), TLCK (Art.Nr. 17013) und Diisopropylfluorophosphat (Art.Nr. 77205) von der Fa. Serva, Heidelberg.

### 3.3. Spezielle Puffer

|                                       |                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PB-Puffer, PH 8,0                     | 3 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ x 2 $\text{H}_2\text{O}$<br>57 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ x 2 $\text{H}_2\text{O}$<br>$\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml |
| PBS-Puffer, PH 8,0                    | wie PB-Puffer mit 43,6 mM NaCl                                                                                                                         |
| PBG-Puffer, PH 8,0                    | 50 mM Glucose x $\text{H}_2\text{O}$<br>PB-Puffer ad 1000 ml                                                                                           |
| PBSGH-Puffer, PH 8,0                  | 50 mM Glucose x $\text{H}_2\text{O}$<br>5000 USP-Einheiten Heparin<br>PBS-Puffer ad 1000 ml                                                            |
| Britton-Robinson-<br>Universalpuffer: | 28,57 mM Citronensäure<br>28,57 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>28,57 mM Barbitol<br>28,57 mM Borsäure<br>0,2 N NaOH<br>$\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml |

#### 4. Arbeitsvorschriften

##### 4.1. Meßverfahren für Trypsininhibitoren

##### 4.1.1. Herstellung der Lösungen

Nach einer ungefähren Abschätzung der Löslichkeit werden zwischen 2 - 20 mg Inhibitor auf einer analytischen Mikrowaage eingewogen. Schwer lösliche Substanzen werden in 13 ml Polystyrolröhrchen mit 10 ml Dimethylsulfoxyd, gut lösliche Substanzen in 100 ml Polypropylengefäßen mit 100 ml Bidest gelöst. Die Proben werden je nach Bedarf in einem Ultraschallbad behandelt und wieder abgekühlt. Folgende Lösungen werden weiterhin benötigt:

I TRIS-Puffer: 0,2 molar, PH 8,1 mit 20 mM  $\text{CaCl}_2$ .

II Trypsinlösung; 62,5  $\mu\text{g/ml}$   $10^{-3}$  molarer HCl.

III Substratlösung: S-2 : 1 Gramm N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilidhydrochlorid wird in 255,5 ml bidest. Wasser unter Erwärmen gelöst und wieder abgekühlt.

IV Substratlösung S-1: Ein Volumenteil von III wird mit zwei Volumenteilen bidest. Wasser verdünnt.

##### Haltbarkeit und Lagerung der Lösungen:

Die Enzymlösung wird immer auf Eis aufbewahrt und jede Woche frisch bereitet. Um Bakterienbefall durch längere Lagerung zu vermeiden, wird der Puffer in nicht größeren Mengen als einem Liter bereitet.

Die Substratlösungen werden in dunklen Flaschen vor Licht geschützt, aber nicht im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Messung werden die Lösungen I, III und IV im Wasserbad auf 37°C vortemperierte. Die 20 Meßküvetten mit vier ml Fassungsvermögen werden ebenfalls im temperierbaren Küvettenhalter vorgewärmt. Eine mit Glycerin gefüllte, verschlossene Küvette, in welche ein Thermometer eintaucht, dient zur Temperaturkontrolle.

Die Messung wird bei 405 nm mit dem Zeiss-Spektralphotometer PM 2K durchgeführt, dessen Küvettenhalter an das 37°C warme Wasserbad angeschlossen ist.

Die Lösungen werden in der Reihenfolge, wie sie im Testansatz von Kapitel 1.7.1.1. angegeben ist, in die vorgewärmten Küvetten pipettiert. Die Substratzugabe erfolgt nach fünfminütiger Inkubationszeit. Nach einer gründlichen Vermischung des Inhalts mit einem Plastikspatel wird die Küvette in das Photometer überführt, die Extinktion bei Start der Stoppuhr abgelesen und darauf wieder in den temperierten Küvettenhalter zurückgegeben. Nach fünf Minuten erfolgt die zweite Messung.

Aus den beiden Messungen wird der  $\Delta E/\text{Minute}$ -Wert ermittelt.

#### Vormessung:

Zur Erfassung des 30- bis 70 %igen Hemmbereichs werden vier Küvetten angesetzt. 0,01 ml, 0,1 ml und 0,5 ml der Inhibitorstammlösung werden neben einem Leerwert ohne Inhibitor angesetzt und die Hemmung bei  $10^{-3}$  molarer Substratkonzentration (S-1) ermittelt.

Mit Hilfe der realen Hemmkurve lassen sich, wie in Kapitel 1.7.2.1. beschrieben, die Inhibitorkonzentrationen für eine 30-70 prozentige Hemmung gut ermitteln.

War die Hemmung zu schwach, wurde mehr Substanz eingewogen, im anderen Fall, je nach Bedarf mit Wasser oder DMSO verdünnt. Nach Ermittlung der Inhibitormengen werden für die Messung mit der ersten Substratkonzentration zehn Küvetten angesetzt, von denen zwei als Leerwerte dienen. Die Zugabe des Substrats beginnt zweckmäßig mit der letzten Küvette, in welcher die höchste Inhibitorkonzentration vorliegt. Die Ansätze werden, mit Küvette 1 beginnend, im Abstand von einer halben Minute aufeinanderfolgend im Intervall von fünf Minuten gemessen. Das Verfahren wird entsprechend mit der zweiten Substratkonzentration (S-2) wiederholt.

#### 4.1.2. Auswertung der Meßergebnisse

Die Auswertung der 20 Werte erfolgt nach der Methode von Dixon<sup>96)</sup>.

Der reziproke Wert der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  ( $\Delta E/\text{Min}$ ) wird auf der Ordinate gegen die entsprechende Inhibitormenge ( ml Stammlösung oder molare Testkonzentration) auf der Abszisse aufgetragen.

Bei einer Auswertung mit Computer wird die Inhibitorkonzentration als molare Testkonzentration eingegeben und der KI-Wert direkt ausgedruckt.

Bei manueller Auswertung mit Auftragen der Inhibitormenge (ml Stammlösung) berechnet sich die Dissoziationskonstante wie folgt:

$$KI = \frac{E}{a} \times F \times \frac{1000}{MG} \times \frac{b}{3} \text{ (M)}$$

E = Einwaage des Inhibitors (g).

a = Volumen Lösungsmittel der Einwaage (ml).

MG = Molgewicht des Inhibitors (g).

b = Positiver Abszissen-Wert des Schnittpunkts der beiden Substratkonzentrationen S-1 und S-2.

F = Eventueller Verdünnungsfaktor.

#### 4.2. Arbeitsvorschriften zu Versuchen mit Trypanosomen<sup>a</sup> und Trypanosomenrohextrakt

##### 4.2.1. Aufzucht von Trypanosomen

Die Trypanosomen wurden ausschließlich aus dem Blut infizierter Ratten gewonnen. Zur Infektion der Tiere diente ein Stamm von T.rhodesiense der Firma Hoechst, welcher über Mäusepassage gehalten wurde. Zwanzig Ratten werden nach Lieferung nummeriert, gewogen (etwa 300 g) und zu je fünf Tieren im Käfig gehalten. Nach einem Tag werden sie je nach Gewicht mit 0,2 - 0,4 ml

a Herrn Dr.Dr. E. Fink und Herrn Prof.Dr. J. Bafort danke ich für freundliche Unterstützung und vielseitige Ratschläge.

Herrn G. M i n e t danke ich sehr herzlich für die kameradschaftliche Hilfe bei allen Tierversuchen.

hoch kontaminösem Citratblut aus Mäusen intraperitoneal infiziert. Zur Kontrolle der Infektion wird nach 30 Stunden ein Blutabstrich genommen. Nach drei bis vier Tagen ist die Infektion soweit fortgeschritten, daß im mikroskopischen Abstrich mehr als 200 Trypanosomen pro Gesichtsfeld zu sehen sind. Nach einer Äthernarkose wird das Herz durch Öffnen des Thoraxraums freigelegt und mit einer heparinisierten 20 ml Einmalspritze punktiert. Das gewonnene Blut, etwa 8 - 14 ml pro Tier, wird in 50 ml eiskühlem PBGSH aufgenommen.

#### 4.2.2. Säulenchromatographische Reinigung der Trypanosomen von Blutbestandteilen nach der Methode von L a n - h a m <sup>139)</sup>

##### 4.2.2.1. Chromatographieanordnung

Zur Chromatographie wurden zehn methanolgekühlte Glassäulen (20 x 3,7 cm Innenmaß) benutzt, deren kurzer Auslauf durch einen Gummischlauch mit Quetscher verschlossen war.

Die obere Öffnung war während der Chromatographie luftdicht mit einem durchbohrten Gummistopfen geschlossen, durch den ein verschiebbares Glasrohr führte, welches die Pufferzufuhr direkt auf die Geloberfläche ermöglichte. Ein gemeinsames 4 Liter-Puffervorratsgefäß versorgte alle zehn Säulen gleichmäßig über dünne Schläuche, die auf die Glasrohre des Gummistopfens gesteckt und mit einem Rollen-Quetscher (aus Infusionsbestecken) versehen waren. Das Puffervorratsgefäß ließ sich durch einen Seilzug in eine beliebige Höhe (bis drei Meter) über das Säulenniveau bringen. So konnte die Chromatographiegeschwindigkeit jederzeit beeinflusst werden.

##### 4.2.2.2. Durchführung der Chromatographie

Die mit PBGSH vorbehandelte Diäthylaminoäthylzellulose wird mit einem Bettvolumen von 120 - 130 ml luftblasenfrei in die Säule gefüllt und mit einem Rundfilter abgedeckt. Nach Sedi-

mentieren und Nachwaschen mit PBSGH wird mit einer Vollpipette 20 ml Blut/Puffer-Gemisch auf jede Säule aufgetragen. Wenn die Probe bis zum Filterpapier eingesunken ist, wird die Säule mit dem Gummistopfen verschlossen, das Glasrohr der Pufferversorgung vorsichtig auf das Filterpapier gesetzt und mit der Chromatographie begonnen. Das Trypanosomeneluat wird in eisgekühlten Vorlagen aufgefangen, von Zeit zu Zeit mit einer Spatelspitze Glucose versetzt und in 200 ml Zentrifugenbechern 20 Minuten mit 10000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Der weiße Trypanosomen-Bodensatz wird mit einem Puffer, je nach weiterem Verwendungszweck, fünfmal gewaschen, wobei dem letzten Puffer 0,002 % Natriumazid zugesetzt wird.

Die Probe wird direkt in weiteren Testen eingesetzt oder bei -28°C eingefroren.

Bei dem Aufzucht- und Chromatographieverfahren wurden durchschnittlich 500 mg Trypanosomen (Naßgewicht nach 22000 UpM, 60 Min.) pro Ratte isoliert.

#### 4.2.3. Sicherheitsvorkehrungen zur Vermeidung von Selbstinfektion

Da Trypanosoma rhodesiense sehr menschenpathogen ist, wurden folgende Sicherheitsvorkehrungen eingehalten:

- I Die Versuche erfolgten in geschlossenen Räumen, deren Zugang unbefugten Personen verwehrt war,
- II alle Arbeiten wurden mit Schutzkittel, Brille und Handschuhen durchgeführt,
- III beim Verlassen des Arbeitsraums werden in einem Vorraum die Schutzkleidung abgelegt und die Hände mit Desinfektionsmittel gründlich gereinigt,
- IV die Labortische werden nach Ende der Versuche zuerst mit Wasser, dann mit Desinfektionsmittel gereinigt,
- V infektiöses Material wird gut verpackt und nach 2 - 3 Tagen in einer Verbrennungsanlage vernichtet,
- VI das Labor bleibt zwei Tage für unbefugte Personen versperrt.

#### 4.2.4. Enzymatische Aktivität intakter Trypanosomen

##### 4.2.4.1. L-Bapa-Testansatz

Frisch isolierte Trypanosomen werden in PBG suspendiert und durch dreimaliges Auszählen der Gehalt an Trypanosomen pro ml ermittelt. Die Probe wird in zwei Portionen geteilt, von denen die eine direkt, die andere erst nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen in den Test eingesetzt wird.

Die Testbedingungen entsprechen, mit Ausnahme des Puffers, der Methode von F r i t z <sup>140</sup>).

##### Testbedingungen:

Temperatur: 22°C, Meßstrahlung: 410 nm. Testvolumen 3 ml.

Substrat-Testkonzentration: 1 mM.

In eine 4 ml Küvette werden 0,1 ml bzw. 0,5 ml der jeweiligen Trypanosomensuspension pipetiert, und mit PBG auf 2 ml aufgefüllt. Nach fünf Minuten wird 1 ml wässrige L-Bapa-Lösung zugesetzt, mit einem Plastikspatel umgerührt und die Extinktion kontinuierlich registriert.

Als Vergleich dient eine Küvette mit 0,5 ml Trypanosomensuspension ohne Substrat und als Leerwert eine Küvette mit Puffer und Substrat.

Im gleichen Test wird die Trypanosomensuspension durch eine definierte Trypsinmenge (6,25 µg) ersetzt. Um die Sicherheit der chromatographischen Trennung zu überprüfen, wurde das Blut einer nicht infizierten Ratte genauso behandelt wie in Kapitel 4.2.2. beschrieben und als Leerwert eingesetzt.

Die Aktivität errechnet sich durch:

$$U/\text{Trypanosom} = \frac{\Delta E \times V}{\Delta t \times \epsilon \times x \times c}$$

$$c = 1,8 \times 10^8 \text{ Trypanosomen/ml}, \epsilon_{410 \text{ nm}} = 8,8 \text{ (cm}^2/\mu\text{M)}.$$

Wenn im selben Ansatz 6,25 µg Trypsin eine Aktivität von  $\Delta E/\text{Min} = 0,108$  haben, entspricht die Anzahl der Trypanosomen im Test  $x$  µg Trypsin.

$$x = \frac{\mu\text{g Trypsin im Test} \times E \text{ (im Trypanosomenansatz)}}{E \text{ (im Trypsinansatz)}}$$

#### 4.2.4.2. Testansatz mit K a b i - Substraten

##### 4.2.4.2.1. Allgemeine Angaben

Da die Substrate alle schwer löslich sind, ist eine Herstellung vollkommen gleicher Konzentrationen sehr schwierig. Von organischen Lösungsmitteln sollte abgesehen werden. Da für die Ermittlung prozentualer Spaltungsraten gleiche Testkonzentrationen Voraussetzung sind, wurden die Substratlösungen wie folgt hergestellt:

25 mg Festsubstanz der einzelnen Substrate werden in einer definierten Volumenmenge Bidest mit 0,002 % Natriumazid aufgenommen, daß sich eine theoretische Konzentration von 2 mM ergibt. Nach zehnminütiger Behandlung im Ultraschallbad werden alle Lösungen mit einem Hartfilter filtriert und die Konzentration photometrisch bei 316 nm bestimmt. Es werden die Mengen berechnet, die im Testvolumen von 0,75 ml eine  $5 \times 10^{-4}$  M Substratkonzentration ergeben (theoretisch 0,188 ml).

Diese Substratmengen oder ein Vielfaches werden in allen Kabi-Testen eingesetzt.

#### Allgemeiner Kabi-Test:

Meßstrahlung: 410 nm; Mikroküvette 1,6 ml; Testvolumen: 0,75 ml.

| ml    | Substrat | ml Puffer | ml Probe |
|-------|----------|-----------|----------|
| 0,172 | S-2251   | 0,578 - a | a        |
| 0,211 | S-2222   | 0,539 - a | a        |
| 0,184 | S-2302   | 0,566 - a | a        |
| 0,193 | S-2238   | 0,557 - a | a        |
| 0,255 | S-2266   | 0,495 - a | a        |

#### 4.2.4.2.2. Testansatz mit intakten Trypanosomen Inkubation in Zentrifugenröhrchen

In 13 ml Zentrifugenröhrchen werden jeweils 1 ml einer Trypanosomensuspension in PBG mit PBG und Substrat (dreifache Menge des allgemeinen Ansatzes) versetzt, verschlossen und 40 Minuten bei 22°C langsam rotiert. Dann wird 10 Minuten bei 20000 UpM zentrifugiert und der klare Überstand in eine Küvette überführt und die Extinktion bei 410 nm bestimmt. Jeweils ein Wert ohne Substrat und ohne Trypanosomen wird mitgeführt. Die Messung wird dreimal wiederholt und aus den unterschiedlichen Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

#### 4.2.4.2.3. Inkubation in der Meßküvette

Um das Volumen des Testansatzes zu verkleinern und auch während der Inkubation eine Messung zu ermöglichen, wurden intakte Trypanosomen in 1,6 ml Mikroküvetten direkt inkubiert (Testvolumen 0,75 ml).

Vor der jeweiligen Messung werden die Küvetten direkt in eine Tischzentrifuge überführt und so ausgerichtet, daß die geriffelte Griffseite in Zentrifugalrichtung steht. Nach zehn Minuten Zentrifugation mit 3000 UpM haben sich die Trypanosomen an dieser Seite so festgesetzt, daß die klare Lösung photometrisch gemessen werden kann. Soll danach weiter inkubiert werden, so kann der Niederschlag wieder aufgewirbelt und zur weiteren Messung erneut abzentrifugiert werden.

Die in diesem Meßansatz ermittelten prozentualen Spaltungsraten stimmen mit den Ergebnissen des ersten Testansatzes überein.

#### 4.2.4.3. Hemmansatz intakter Trypanosomen mit Substrat S-2251

Testvolumen: 1,6 ml, Temperatur: 22°C, Meßstrahlung: 410 nm.  
In 13 ml Zentrifugenröhrchen werden jeweils 1 ml Trypanosomen-

Lösung mit 0,1 ml Puffer, Trasylol<sup>R</sup>-, Antipain-, Sojabohnen-trypsininhibitor-Lösung (Testkonzentration 130 µg/ml) oder DAPI-Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration inkubiert. Nach 10 Minuten wird die Reaktion mit 0,5 ml S-2251 gestartet und wie oben weiterbehandelt. Die Hemmung der einzelnen Ansätze gegenüber zwei Leerwerten wird nach 20 Minuten Reaktionszeit ermittelt. Für jeden Meßwert wird ein Leerwert ohne Trypanosomensuspension mitgeführt und bei der Berechnung berücksichtigt.

#### 4.2.4.4. Testansatz mit Azocasein als Substrat für intakte Trypanosomen

Der Azocaseintest ist in Kapitel 4.2.5.8. mit Einzelheiten angegeben.

Meßstrahlung: 365 nm, Temperatur: 37°C, Testvolumen: 6 ml.

In 13 ml Zentrifugenröhrchen werden neben zwei Leerwerten 1 ml und 2 ml einer Trypanosomensuspension in PBG pipettiert, zwei Vergleichsproben mit 0,1 ml Trypsinlösung (= 6,25 µg) angesetzt und alle Proben mit PBG auf 2 ml aufgefüllt. Die Röhrchen werden in einem Wasserbad bei 37°C 10 Minuten inkubiert.

Im Abstand einer halben Minute werden alle Proben mit 3 ml einer zweiprozentigen Azocaseinlösung in PBG versetzt, umgeschwenkt, verschlossen und wieder in das Wasserbad zurückgestellt. Mit Substratzugabe zur ersten Probe wird die Stoppuhr gedrückt. Nach 20 Minuten wird wieder im Abstand einer halben Minute, beginnend mit der ersten Probe, die Enzymreaktion durch 3 ml einer fünfprozentigen (w/v) Trichloressigsäure gestoppt. Die Röhrchen werden geschwenkt und nach 30-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert oder durch einen Hartfilter filtriert. Die klaren Lösungen werden bei 365 nm in Plastikküvetten mit einem Zentimeter Schichtdicke gegen den Leerwert<sup>a</sup> (Puffer statt Enzym) gemessen.

a Es werden immer mindestens zwei Leerwerte angesetzt und der Mittelwert zur Berechnung herangezogen.

Die Aktivität der Trypanosomen wird, wie in Kapitel 4.2.4.2. beschrieben, auf die spezifische Aktivität von Trypsin bezogen.

#### 4.2.5. Enzymatische Aktivität im Trypanosomenrohextrakt

##### 4.2.5.1. Lagerung der Trypanosomen

Wenn die isolierten Trypanosomen nicht direkt weiterverarbeitet werden sollten, wurden sie bei  $-28^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Vergleiche zwischen mehreren Aufarbeitungen zeigten, daß bei längerer Lagerung als zwei Monate die Aktivitätsausbeuten stark abfielen. Eine Konservierung bei tieferen Temperaturen ist daher sinnvoll.

##### 4.2.5.2. Aufschluß der Trypanosomenzellen

1 Gramm (Naßgewicht) tiefgefrorener Trypanosomen werden mit 5 ml Bidest versetzt und unter leichtem Schwenken langsam aufgetaut, wieder eingefroren und nochmals aufgetaut. Die Suspension wird bei  $4^{\circ}\text{C}$  eine Stunde lang mit 22000 UpM zentrifugiert. Wenn der Überstand keine Trübung aufweist (Lichteinfall), wird er mit einer Pipette vorsichtig in ein beschriftetes Reagenzglas überführt und im Eisbad aufbewahrt (Probe 1).

Das Sediment der Trennung wird nochmals mit 5 ml einer 0,1-%igen, wässrigen Triton-X-100-Lösung aufgenommen und genauso wie Probe 1 behandelt. Das abgetrennte Zentrifugat dient als Probe 2.

Das Sediment wird wiederum in 5 ml der gleichen Lösung aufgenommen und fünfmal für je zwei Sekunden in ein Ultraschallbad gehalten. Zwischen den Ultraschallbehandlungen wird die Suspension immer wieder in einem Eisbad (5 Minuten) gekühlt.

Nach der Zentrifugation und Abtrennen des klaren Überstands (= Probe 3) wird das Sediment zum Schluß mit  $10^{-3}$  molarer HCl in gleicher Weise bearbeitet.

Das Zentrifugat (= Probe 4) wird aufbewahrt und das Sediment verworfen.

Die Proben 1 bis 4 können einzeln weiterverarbeitet oder vereint werden.

Sie werden, je nach Verwendungszweck gegen einen Puffer dialysiert, dem 0,002 % Natriumazid zugesetzt. Die Probe wird immer im Eisbad gelagert.

#### 4.2.5.3. L-Bapa-Testansatz für Trypanosomenrohextrakt und gereinigte Proben

Wenn keine anderen Angaben gemacht werden, gelten immer folgende Meßbedingungen:

Meßstrahlung: 410 nm, Temperatur: 37°C, Testvolumen: 1,5 ml, Substratkonzentration: 3 mM (S-2).

In vorgewärmte 1,6 ml-Mikroküvetten wird die Probe (0-0,5 ml) pipettiert und mit 0,05 M Tris-Puffer, PH 8,0, auf 1 ml aufgefüllt und der Küvetteninhalt durch leichtes Schwenken vermischt. Die Probe wird 15 Minuten bei 37°C inkubiert, mit 0,5 ml Substratlösung (S-2) versetzt und umgerührt. Mit Ausnahme bei Routinemessungen von Chromatographiefractionen werden bei übrigen Aktivitätsbestimmungen die Extinktionen pro Minute bestimmt und die Linearität der Messung kontrolliert.

Die spezifische Aktivität pro Gramm Trypanosomen oder Aktivität pro mg Protein wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{U/Gramm Trypanosomen}}{(\text{U/mg Protein})} = \frac{\Delta E \times V \times a}{\epsilon \times \Delta t \times v \times b}$$

V = Testvolumen, v = Probevolumen,  $\epsilon_{410 \text{ nm}} = 8,8 \text{ (cm}^2/\mu\text{M)}$

b = Menge der lysierten Trypanosomen (g)  
(Proteingehalt des Lysats (mg))

a = Zum Lysieren eingesetztes Volumen (ml).

Ein Vergleich der spezifischen Aktivität von Trypsin im gleichen Testansatz mit der eingesetzten Trypanosomenmenge berechnet sich wie in Kapitel 4.2.4.1. angegeben.

$$x = \frac{\mu\text{g Trypsin im Test} \times \Delta E/\text{Min im Trypanosomen-Ansatz}}{\Delta E/\text{Min im Trypsinansatz}}$$

#### 4.2.5.4. L-BAEE-Testansatz für Trypanosomenrohextrakt

Der Test entspricht dem von T r a u t s c h o l d <sup>141)</sup> angegebenen Verfahren der Kallikreinbestimmung. Die spezifische Aktivität errechnet sich nach der Formel des L-Bapa-Ansatzes mit folgenden Größen:

$$V = 3,02 \text{ ml}, \epsilon_{365 \text{ nm}} = 3,4 \text{ (cm}^2/\mu\text{M)}.$$

Die Linearität im Ansatz war schlechter als im L-Bapa-Test. Daher wurde diese Bestimmung nicht weiter eingesetzt.

#### 4.2.5.5. Testansatz mit K a b i - Substraten für Trypanosomenrohextrakt und gereinigte Proben

Wenn keine besonderen Angaben gemacht werden, gelten folgende Meßbedingungen:

Meßstrahlung: 410 nm, Temperatur: 37°C, Testvolumen: 0,75 ml.

In vorgewärmte Mikroküvetten werden a ml Probe (a = 0,01 ml - 0,5 ml) pipettiert und mit 0,05 M Tris-Puffer, PH 8,0, versetzt, umgeschwenkt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wird das jeweilige Substrat zugegeben, umgerührt und die Extinktion über fünf oder zehn Minuten in einminütigem Abstand gemessen. Dabei müssen die Extinktionsdifferenzen konstant bleiben.

Die zu pipettierenden Substrat- und Puffervolumen entsprechen den Angaben in Kapitel 4.2.4.2.1. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt mit der Formel in Kapitel 4.2.5.3.

#### 4.2.5.6. Plasminogenaktivierung im Rohextrakt durch Streptokinase

Der Test entspricht der Methode von F r i b e r g e r e r und K n ö s <sup>142)</sup>.

Testbedingungen: Meßstrahlung 410 nm, Temperatur 37°C, Testvolumen: 1,25 ml, Probevolumen: 0,1 ml und 0,2 ml in Testpuffer. Für jede Probe werden drei Tests (A-C) angesetzt.

Im Test A wird freies Plasmin und freier Plasminogen-Streptokinasekomplex ermittelt:

In die vorgewärmte Küvette werden 0,1 ml Probe und 0,3 ml - 0,05 m Tris-Puffer (PH 7,4) pipettiert und zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit 0,85 ml vortemperierter Substratlösung (S-2251) versetzt, umgerührt und  $\Delta E/\text{Min.}$  bestimmt.

Der Test B erfaßt neben der in A ermittelten Aktivität zusätzlich streptokinase-aktivierbares Plasminogen:

Zu 0,1 ml Probe wird 0,2 ml Puffer pipettiert und mit 0,1 ml Streptokinaselösung (10000 IE/ml Testpuffer) wie oben inkubiert, mit Substrat gestartet und gemessen.

Der Test C enthält zusätzlich Sojabohnentrypsininhibitor und erfaßt demnach nur frei vorliegenden Plasminogen-Streptokinasekomplex und streptokinase-aktivierbares Plasminogen:

Die Probe wird mit 0,15 ml Puffer und 0,05 ml Sojabohneninhibitor (0,1 mg/ml Wasser) inkubiert, dann mit Streptokinase versetzt und wie bei B weiterbehandelt.

Ergebnisse ( $\Delta E/\text{Min.}$  bei 0,1 ml Probe).

Test A: 0,018, Test B: 0,019 und Test C: 0,020.

Streptokinase aktiviert kein Zymogen und die fehlende Differenz zwischen A und C ist durch die Unwirksamkeit des Inhibitors zu erklären. Die zwölfwache S T I - Konzentration hemmt nur 13 % der Aktivität des Rohextrakts (s. Tabelle 23).

#### 4.2.5.7. Kombinierter Aktivitäts- und Hemm-Ansatz mit K a b i - Substraten

Meßbedingungen, Puffer, Mengenverhältnisse und Arbeitsweise entsprechen den Angaben in Kapitel 4.2.5.5. mit folgenden Änderungen:

Nach Substratzugabe und Umrühren wird die Extinktionszunahme kontinuierlich aufgezeichnet (Zeiss-Spektralphotometer DMR 21). Als Leerwert dient ein gleiches Probevolumen in Testpuffer. Nach fünf oder zehn Minuten wird die Messung unterbrochen und in beide Küvetten ein kleines Volumen Inhibitorlösung zugegeben, mit dem gleichen Plastikspatel wie oben umgerührt und die kontinuierliche Messung fortgesetzt. Aus dem Knick der Reaktionskurve (s. Abb. 21 und 22) läßt sich die Hemmung direkt verfolgen. Aus dem Anfangsvolumen  $V_1 = 0,75$  und dem Endvolumen nach Inhibitorzugabe (z.B. 0,05 ml)  $V_2 = 0,80$  ml ergibt sich ein Fehler (hier 6,6 %), der berücksichtigt werden muß.

#### 4.2.5.8. Azocasein-Testansatz für Trypanosomenrohextrakt

Der Test entspricht dem von F r i t z et al. angegebenen Verfahren zur Messung von Trypsin- und Plasmin-Inhibitoren <sup>104)</sup>.

Testbedingungen: Meßstrahlung: 365 nm, Temperatur: 25°C,  
Inkubationsvolumen: 0,7 ml, Inkubationszeit: 1-3 Stunden.

In 13 ml Zentrifugenröhrchen werden 0,01 - 0,3 ml Proteinase-lösung in Testpuffer mit 0,1 M Phosphatpuffer (PH 7,6) auf 0,3 ml aufgefüllt und im Wasserbad 10 Minuten bei 25°C vorinkubiert. Zu dieser Lösung werden 0,4 ml einer 2 %igen Azocaseinlösung in Testpuffer gegeben, umgeschwenkt, verschlossen und in das Wasserbad gestellt. Zum Zeitpunkt der Substratzugabe wird die Stoppuhr gestartet. Nach 1 - 3 Stunden, je nach zu erwartender Aktivität, wird der Ansatz durch 0,7 ml Trichloressigsäure (5 %, w/v) gestoppt, gut vermischt und verschlossen bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Danach wird zentrifugiert oder filtriert und der klare Über-

stand in einer Kuvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen.

Als Leerwerte dienen mindestens zwei Proben, die anstelle der Proteinaseinlösung Puffer enthalten und ein Wert, der anstelle der Proteinaseinlösung eine durch Kochen desaktivierte Probe enthält.

Als Vergleich werden zwei Trypsinproben mit angesetzt (0,02 ml - 0,03 ml = 1,25 µg - 1,88 µg).

Da die Azocaseinspaltung des Rohextrakts gegenüber der Spaltung anderer Substrate so gering war <sup>143)</sup>, mußte eine lange Inkubation angesetzt werden.

Dabei ist aber zu beachten, daß die Extinktion nicht größer als  $E = 0,28$  wird.

In einer Vormessung zeigte sich eine Linearität zwischen Extinktion und Proteinaserohextrakt zwischen  $E = 0,062$  und  $E = 0,280$  ( $\hat{=}$  0,023 ml - 0,062 ml). Wenn ein neues Substrat eingesetzt wird, muß dieser Bereich neu überprüft werden!

#### 4.2.6. Einfluß zweiwertiger Kationen und Kaliumcyanid auf unterschiedliche Testsysteme

##### 4.2.6.1. Stammlösungen

Für die unten stehenden Tests werden folgende Stammlösungen hergestellt:

- 1) Calciumchlorid (32,19 mg in 2,19 ml Wasser)
- 2) Mangansulfat (62,74 mg in 3,7 ml Methanol)
- 3) Magnesiumacetat (30,08 mg in 1,4 ml Wasser)
- 4) Kupfersulfat (43,77 mg in 1,75 ml Wasser)
- 5) Kobaltsulfat (25,53 mg in 0,88 ml Wasser)
- 6) Zinksulfat (4,143 mg in 1,43 ml Wasser)
- 7) Kaliumcyanid (1,332 mg in 2,0 ml Wasser).

#### 4.2.6.2. L-Bapa-Test

Testbedingungen: Meßstrahlung 410 nm, Temperatur: 22°C, Testvolumen: 1 ml, Proteinase: 0,1 ml. L-Bapa (S-1): 0,1 ml.

Um eine Störung durch Trübung zu verhindern, wurde die Substratkonzentration reduziert und zusätzlich die Küvetten, wie in Kapitel 4.2.4.2.3. beschrieben, zentrifugiert. Es wurden nur vollkommen klare Lösungen vermessen:

Zu 0,1 ml Proteinasenlösung werden 0,7 ml bzw. 0,79 ml Tris-Puffer (0,05 M, PH 8,0) und je 0,1 ml von 6) und 7) bzw. 0,01 ml von 1) - 5) pipettiert. Die Lösungen werden 10 Minuten inkubiert und anschließend mit 0,1 ml Substrat vermischt, zentrifugiert und die Extinktionsdifferenz innerhalb von 10 Minuten bestimmt.

Als Vergleich für 1) und 3) - 7) dient der Mittelwert aus zwei Messungen, in denen die Stammlösungen der Metallsalze durch Puffer ersetzt sind. Zwei Vergleichsproben für 2) enthalten anstelle der Stammlösung 0,01 ml Methanol.

Die in Tabelle 22 angegebenen Werte sind aus zwei Messungen ermittelt.

#### 4.2.6.3. Azocasein-Test

Die Testbedingungen entsprechen den Angaben in Kapitel 4.2.5.8.

0,2 ml Proteinase werden mit 0,1 bzw. 0,01 ml Metallsalzlösungen versetzt und mit Phosphatpuffer auf 0,3 ml aufgefüllt. Nach 10 Minuten wird mit 2 %iger Azocaseinlösung gestartet und weiter verfahren wie in Kapitel 4.2.5.8. Für jeden Wert wird mindestens ein Leerwert mitgeführt, in dem bei gleicher Kationenkonzentration die Proteinase durch Puffer ersetzt ist. In je zwei Vergleichsküvetten sind die Stammlösungen durch entsprechende Menge Puffer oder Methanol ersetzt.

#### 4.2.6.4. Testansatz mit K a b i - Substraten

Für die Messung mit den unterschiedlichen K a b i - Substraten werden gemeinsame Proteinase-Kationenlösungen hergestellt:

0,3 ml Proteinase werden mit 0,03 ml von 1) - 3) und 6) und 0,3 ml 7) versetzt und mit Tris-Puffer (0,05 M, PH 8,0) zu 0,6 ml aufgefüllt. Die Proben werden auf Eis aufbewahrt und in folgendem Test eingesetzt:

Meßstrahlung: 410 nm, Temperatur: 22°C, Testvolumen: 0,5 ml.

0,05 ml der obigen Probe werden in die Küvette pipettiert, mit 0,4 ml Puffer versetzt und 10 Minuten inkubiert. Dann wird jeweils 0,05 ml Substratlösung <sup>a</sup> zugegeben und umgerührt. Die Küvetten werden vor der Messung zentrifugiert (s. Kapitel 4.2.4.2.3.).

Zu Vergleichsmessungen werden folgende Proben benutzt:

0,3 ml Proteinase mit 0,3 ml Puffer für 1), 3), 6) und 7) und 0,3 ml Proteinase mit 0,01 ml Methanol und 0,29 ml Puffer für 2).

#### 4.2.7. Einfluß einiger Inhibitoren auf unterschiedliche Aktivitäten des Rohextrakts

##### 4.2.7.1. Stammlösungen

Zur Messung in unterschiedlichen Testsystemen werden folgende Inhibitorstammlösungen hergestellt:

- 1) Diisopropylfluorphosphat (77,2 mg in 4,19 ml Methanol)
- 2) TLCK (5,097 mg in 1,53 ml Methanol)
- 3) TPCK (4,704 mg in 1,53 ml Methanol)
- 4) p-CMB (227,5 mg in 3 ml 1N NaOH)

<sup>a</sup> Die Substratkonzentration dieser Ansätze entsprechen nicht den Konzentrationen im allgemeinen Ansatz (s. Kapitel 4.2.4.2.1.).

- 5) Antipain (20 µg in 1 ml Wasser)
- 6) Trasylol<sup>R</sup> (10 mg in 1 ml Wasser)
- 7) Sojabohnentrypsininhibitor (10 mg in 1 ml Wasser)
- 8) 102/198 (DAPI) (1 mg in 1 ml Wasser)
- 9) 98/202 (Nr. 20) (1 mg in 1 ml Wasser)
- 10) 150/49 (Nr. 24) (1 mg in 1 ml Wasser).

#### 4.2.7.2. Hemmung im Azocaseintest

Der Testansatz entspricht dem Ansatz mit Kationenlösungen in Kapitel 4.2.6.3.

Die Proteinasenlösung wird mit den unterschiedlichen Inhibitorlösungen 10 Minuten lang inkubiert.

Die Azocaseinspaltung wird nach 3 Stunden mit Trichloressigsäure unterbrochen.

Für jeden Inhibitoransatz wird ein eigener Leerwert angesetzt, der anstelle der Proteinasenlösung Puffer enthält. Der Leerwert zu 1) - 3) enthält 0,1 ml Methanol, der Leerwert zu 4) eine äquivalente Menge 1 N NaOH (0,015 ml). Die Vergleichsküvetten enthalten anstelle des Inhibitors bei 1) - 3) 0,1 ml Methanol, bei 4) 0,015 ml 1 N NaOH und bei 5) - 10) 0,1 ml Puffer.

Es ist darauf zu achten, daß die alkalische p-CMB-Lösung in die Puffervorlage pipettiert wird und nicht mit der Proteinasenlösung direkt in Berührung kommt.

Die Diisopropylfluorophosphatlösung muß sehr vorsichtig hergestellt und gehandhabt werden:

Bei allen Arbeiten mit dieser Substanz sollte eine 0,2 N NaOH-Lösung bereitstehen. Es sind immer Schutzhandschuhe und Schutzbrille zu tragen und nach Möglichkeit im Abzug zu arbeiten. Die benutzten Geräte, die mit der Verbindung in Berührung gekommen sind, werden vor weiterer Behandlung 2 Stunden in Natronlauge aufbewahrt.

Diisopropylfluorophosphat konnte auch bei dreifach höherer Testkonzentration keine stärkere Hemmung hervorrufen.

#### 4.2.7.3. Hemmung der Azocaseinspaltung durch unterschiedliche Konzentrationen des Sojabohnentrypsininhibitors, Trasylol<sup>R</sup>, 150/49 und DAPI

Der Test entspricht obigen Angaben mit folgenden Änderungen:

Inkubationsvolumen: 0,8 ml, Proteinase: 0,2 ml.

Es wurden steigende Inhibitorkonzentrationen mit der Proteinase inkubiert und die Restaktivität gegenüber drei ungehemmten Ansätzen ermittelt. Für jeden Wert ist ein Leerwert mit Puffer statt Proteinase mitzuführen. Für den ungehemmten Ansatz werden zwei Leerwerte angesetzt.

Die Messung mit zwölf unterschiedlichen DAPI-Konzentrationen ergab eine nicht lineare Hemmung.

Ab einer Konzentration von 40 µg/ml fiel die Aktivität linear bis zu 30 % ab, um dann zwischen 70 µg und 90 µg wieder auf 73 % Aktivität anzusteigen und wiederum linear bis 0 % Aktivität (bei 120 µg/ml) abzufallen. Ein Vergleich der Extinktionen von Hemmansätzen und Leerwerten läßt vermuten, daß DAPI und Azocasein in Wechselwirkung treten:

Während die Extinktion der Hemmansätze in strenger Linearität zu der Inhibitorkonzentration steht, weist die ebenfalls lineare Extinktionszunahme der Leerwerte zwischen 70 und 80 µg/ml einen deutlichen Knick auf.

#### 4.2.7.4. Hemmansatz mit K a b i - Substraten

Für die Messung mit den unterschiedlichen K a b i - Substraten wurden Proteinase-Inhibitorstammlösungen hergestellt, die auf Eis aufbewahrt und in den einzelnen Testen eingesetzt wurden:

0,3 ml Proteinasenlösung wurde mit je 0,03 ml Inhibitorlösung 1), 5) - 10) bzw. 0,015 ml 4) und je 0,3 ml 2) und 3) versetzt und mit Tris-Puffer (0,05 M, PH 8,0) auf 0,6 ml aufgefüllt.

Nach 30 Minuten Inkubation im Eisbad wird jede Probe auf Restaktivität gegenüber den einzelnen Substraten getestet. Die Testbedingungen sind identisch mit denen von Kapitel 4.2.6.4.

0,3 ml Proteinasenlösung mit 0,3 ml Puffer dient als Vergleichs-Stammlösung für die Werte 1), 5) - 10), 0,3 ml Proteinasenlösung mit 0,285 ml Puffer und 0,015 ml 1 N NaOH für Wert 4) und 0,3 ml Proteinase mit 0,3 ml Methanol war Vergleich für 2) und 3).

Die Hemmungen gegenüber den Kabisubstraten, die in Tabelle 23 aufgeführt sind, wurden in nur einer Messung ermittelt.

#### 4.2.7.5. Hemmung im L-Bapa-Test

Der Inhibitortest entspricht den Angaben in Kapitel 4.2.6.2. 0,1 ml Proteinase werden mit Puffer und Inhibitor 30 Minuten lang inkubiert und die verbleibende Aktivität gegenüber dem Vergleichswert bestimmt. Es wurden drei Messungen durchgeführt und die Mittelwerte gebildet. Auch in diesem Test konnten höhere Konzentrationen von Diisopropylfluorophosphat keine stärkere Hemmung hervorrufen.

#### 4.2.8. Spaltung von p-Guanidinobenzoesäure-4'-nitrophenylester durch Trypanosomenrohextrakt

6,366 mg p-Guanidinobenzoesäure-4'-nitrophenylester in 1,89 ml Methanol dienen als Substratlösung.

Testansatz: Meßstrahlung: 405 nm, Temperatur: 37°C, Testvolumen: 1,0 ml, Substratkonzentration: 0,5 mM.

In vorgewärmte Meßküvetten werden 0,05 ml und 0,1 ml unterschiedliche Proteinasenproben (Probe 1 - 4 in Tabelle 20) pipetiert und mit Tris-Puffer (0,05 M, PH 8,0) zu 0,8 ml aufgefüllt. Nach einer zehnmütigen Inkubation wird mit 0,1 ml Substratlösung versetzt und die Extinktion registriert. Die Abspaltung von p-Nitrophenol verlief über 20 Minuten hinaus streng linear. DAPI konnte die Reaktion in einer Konzentration von 10 µg/ml nicht beeinflussen. Die Differenz der Extinktionen des Ansatzes ohne Substrat und der Extinktion direkt nach Substratzugabe war sehr gering (kleiner als 0,004 E). Die  $\Delta E/\text{Min.}$ -Werte der p-GBNP-Spaltung lagen zwischen  $E = 0,044$  -  $E = 0,055$ .

#### 4.2.9. Temperaturoptima mit K a b i - Substraten

Testansatz: Meßstrahlung: 410 nm, Testvolumen: 0,5 ml.

0,02 ml Proteinase (bei Substrat S-2251 und S-2302) bzw. 0,04 ml (bei Substrat S-2238) werden in die vortemperierte Mikroküvette pipettiert und mit 0,38 bzw. 0,36 ml Tris-Puffer (0,05 M, PH 8,0) versetzt. Die Probe verbleibt 15 Minuten bei angegebener Temperatur, bevor sie mit 0,1 ml des betreffenden gleichtemperierten Substrats vermischt wird. Zwischen den Extinktionsmessungen bei  $t_0$  Min. und  $t_5$  Min. wird die Küvette bei gleicher Temperatur gehalten.

#### 4.2.10. PH-Optima des Rohextrakts bei verschiedenen Substraten

Die Aktivitätsmessungen bei den einzelnen PH-Werten sind in drei Puffern ermittelt worden:

- 1) Citrat (0,1 M) PH 2-5
- 2) Phosphat (0,1 M) PH 5-8
- 3) Tris (0,1 M) PH 8-9, 75.

Das Proteinasegemisch liegt in Bidest vor.

Die Messungen wurden dreimal mit je frisch bereiteten Pufferlösungen durchgeführt. Die L-Bapa-Spaltung wurde ebenso mit einem Britton-Robinson-Universalpuffer (PH 2,6 - 10) gemessen. Der Verlauf der Kurven entspricht einander, das Optimum liegt bei PH 8,8 (anstelle PH 8,25 bei Citrat/Phosphat/Tris).

##### 4.2.10.1. L-Bapa

Meßstrahlung: 410 nm, Temperatur: 22°C, Testvolumen: 0,5 ml.

0,04 ml Proteinase werden mit 0,36 ml Puffer inkubiert und die Reaktion mit 0,1 ml Substratlösung (S-1) gestartet. Die Extinktionsdifferenz innerhalb von 10 Minuten wird bestimmt.

Für jeden PH-Wert ist ein Leerwert mitzuführen, in dem die Pro-

teinase durch Puffer ersetzt ist. Die L-Bapa-Spaltung dieses Werts wird vom Meßwert abgezogen.

#### 4.2.10.2. K a b i - Substrate ohne Inhibitorzusatz

Testbedingungen: Meßstrahlung: 410 nm, Temperatur: 22°C, Testvolumen: 0,5 ml.

0,04 ml Proteinase werden mit 0,36 ml Puffer inkubiert und nach 10 Minuten mit dem jeweiligen Substrat versetzt und 4E/Min. ermittelt.

Im Gegensatz zu dem L-Bapa-Test werden in diesem Ansatz nur fünf Leerwerte (PH 8,25 - PH 9,75) mitgeführt, um die teuren Kabi-Substrate einzusparen.

Im PH-Bereich < 8,25 ist keine Eigenspaltung der K a b i -Substrate festzustellen.

#### 4.2.10.3. K a b i - Substrate in Gegenwart von DAPI und Trasylo<sup>R</sup>l

Eine Proteinasenlösung wird mit DAPI (84 µg/ml) oder Trasylo<sup>R</sup>l (875 µg/ml) 10 Minuten inkubiert. Diese Proteinasenlösung wird im obigen Test eingesetzt. Bei einer Proteinasenmenge von 0,04 ml liegt im Test eine DAPI-Konzentration von 6,7 µg/ml (=  $2 \times 10^{-5}$  M) und Trasylo<sup>R</sup>l-Konzentration von 70 µg/ml vor.

#### 4.2.10.4. Azocasein

Testbedingungen: Meßstrahlung: 365 nm, Temperatur: 25°C, Inkubationsvolumen: 0,8 ml.

In 13 ml Zentrifugenröhrchen werden 0,2 ml Proteinase mit 0,4 ml Puffer 10 Minuten lang inkubiert.

Die Reaktion wird mit 0,2 ml einer 4 %igen Azocaseinlösung in Bidest. Wasser gestartet. Nach zweistündiger Reaktionszeit wird mit 0,8 ml Trichloressigsäure unterbrochen.

#### 4.2.11. Einfluß von Natriumazid auf die L-Bapa-Spaltung

Im L-Bapa-Test von Kapitel 4.2.5.3. werden 0,2 ml Proteinase-rohextrakt mit unterschiedlichen  $\text{NaN}_3$ -Konzentrationen inkubiert und die Restaktivität bestimmt.

|                                 |       |       |       |       |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| $\text{NaN}_3$ -Konzentration : | 0 %   | 0,3 % | 0,7 % | 1,3 % |
| Extinktion/Minute :             | 0,045 | 0,049 | 0,046 | 0,049 |

#### 4.2.12. Stabilität des Trypanosomenrohextrakts im L-Bapa-Test

Im L-Bapa-Test von Kapitel 4.2.5.3. werden täglich 0,2 ml einer Probe untersucht, die in einem Polypropylenröhrchen auf Eis gelagert ist. Die gemessenen Aktivitäten sind unten angegeben:

| Std. | $\Delta E/\text{Min.}$ | Std. | $\Delta E/\text{Min.}$ | Std. | $\Delta E/\text{Min.}$ |
|------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|
| 1    | 0,054                  | 48   | 0,044                  | 168  | 0,048                  |
| 2    | 0,049                  | 67   | 0,047                  | 258  | 0,043                  |
| 3    | 0,048                  | 96   | 0,043                  | 259  | 0,042                  |
| 6    | 0,046                  | 109  | 0,051                  | 311  | 0,029                  |
| 8    | 0,044                  | 111  | 0,051                  | 331  | 0,034                  |
| 9    | 0,045                  | 121  | 0,049                  | 402  | 0,038                  |
| 24   | 0,047                  | 137  | 0,046                  | 429  | 0,039                  |

#### 4.2.13. Kupplung von kationischen Liganden an CH-Sepharose 4-B

##### 4.2.13.1. Kupplung von p-Aminobenzamidin mit CH-Sepharose 4-B

Die Herstellung des Gels erfolgt nach der bei S c h l e u -  
n i n g et al. <sup>144)</sup> beschriebenen Methode.

5 Gramm CH-Sepharose 4-B werden in 50 ml 0,1 M MES, PH 4,75

(4-Morpholino-äthansulfonsäure) gequollen und der Pufferüberstand verworfen. Der Vorgang wird mit weiteren 50 ml wiederholt. Eine Lösung von 5 Gramm Carbodiimid (N-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)carbodiimid) in 50 ml MES werden dem gequollenen Gel zugegeben und die Mischung 30 Minuten bei Zimmertemperatur vorsichtig bewegt.

Dann wird 1 Gramm kristallines p-Aminobenzamidin in kleinen Portionen zugegeben und die Mischung fünf Stunden lang leicht in Bewegung gehalten. In einer G-3-Glasfritte läßt sich dann das Gel abnutschen. Mit 200 ml MES wird das Material mehrmals aufgewirbelt und trocken gesaugt. Mit 0,05 Tris und 0,5 NaCl wird solange nachgewaschen, bis kein p-Aminobenzamidin mehr im Eluat photometrisch nachweisbar ist.

#### 4.2.13.2. Kupplung von 2-(4-Aminophenyl)imidazolinin mit CH-Sepharose 4-B

Entsprechend obiger Vorschrift werden 1 Gramm CH-Sepharose 4-B mit 0,5 g 2-(4-Aminophenyl)imidazolinin inkubiert und von überschüssigem Ligand freigewaschen.

Dazu waren insgesamt 500 ml Puffer nötig, die gesammelt und photometrisch auf Ligandkonzentration untersucht wurden.

Von der eingesetzten Substanz ließen sich 470 mg wieder auswaschen. Das entspricht einem Kupplungsgrad von 6 %.

#### 4.2.13.3. Kupplung von 6-Amidino-2-(4-aminophenyl) indol Dihydrochlorid an CH-Sepharose 4-B

1 Gramm Sepharose werden, wie in Kapitel 4.2.13.1. beschrieben, vorbehandelt und mit 0,5 Gramm Ligand gekuppelt. Die Reaktionszeit beträgt fünf Stunden. Das Gel wird solange abwechselnd mit 2 M Guanidinlösung und  $10^{-3}$  M HCl gewaschen, bis keine Fluoreszenz im Waschwasser mehr nachweisbar ist.

Von beiden Lösungen wurden etwa 300 ml benötigt.

4.2.13.4. Kupplung von 2-(4-Aminophenyl)-6-(2-imidazolin-2-yl) indol Dihydrochlorid CH-Sepharose 4-B

1 Gramm Sepharose und 0,5 Gramm Ligand werden entsprechend obiger Vorschrift (Kapitel 4.2.13.3) gekuppelt. Das Auswaschen des überschüssigen Liganden gelang mit jeweils 200 ml 2 M Guanidininlösung und  $10^{-3}$  M HCl.

4.2.13.5. Kupplung von 6-Amidino-2-[4(4-aminophenoxy)phenyl] - indol Dihydrochlorid mit CH-Sepharose 4-B

Entsprechend der Vorschrift in Kapitel 4.2.13.1. werden 1 Gramm Sepharose mit 0,1 Gramm Ligand gekuppelt. Nach fünfstündiger Reaktionszeit wurde mit folgenden Lösungen ungekuppelter Ligand ausgewaschen:

100 ml MES, PH 4,75; 500 ml 0,05 M Tris, PH 8,0; 500 ml 2,0 M Guanidin; 1000 ml  $10^{-3}$  mM HCl; 100 ml 2,0 M Guanidin und abschließend mit 500 ml 0,05 M Tris, PH 8,0.

Das Waschwasser enthielt immer noch Ligand. Erst nach einer wiederholten Behandlung mit allen Puffern, enthielt die letzte Flüssigkeit keinen Liganden mehr. Die 2 M Guanidinlösung fluoreszierte jedoch immer noch schwach.

4.2.13.6. Kupplung von 2-[4-(4-Aminophenoxy)phenyl] -6-(2-imidazolin-2-yl) indol Dihydrochlorid mit CH-Sepharose 4-B

8 Gramm Sepharose werden wie in Kapitel 4.2.13.1. vorbehandelt und mit einer Lösung von 8 Gramm Carbodiimid in 80 ml MES 30 Minuten inkubiert.

Dieser Mischung wird ein Gramm Ligand in kleinen Portionen unter leichter Bewegung zugegeben.

Nach fünf Stunden wird der überschüssige Ligand ausgewaschen. Dazu wurden insgesamt fast 6 Liter Lösungsmittel benötigt:

200 ml MES, PH 4,75; 2000 ml 2 M Guanidinlösung; 2000 ml  $10^{-3}$  M HCl; 1000 ml 0,05 M Tris, 0,5 M NaCl, PH 8,0 und 500 ml 0,05 Tris, PH 8,0.

Bei wiederholter Elution mit Guanidinlösung trat immer noch schwache Fluoreszenz im Waschwasser auf. Die obigen Schwierigkeiten deuten darauf hin, daß besonders die großen Indolmoleküle durch nicht-kovalente Bindungen auf der Sepharose stark gebunden werden.

Ähnliche Bindungsverhältnisse treten auch dann auf, wenn der obige Ligand mit einer nicht aktivierten Sepharose, z.B. Sephadex G-50, inkubiert wird.

#### 4.2.14. Chromatographieversuche mit DNA und Trypsin

##### 4.2.14.1. Verträglichkeit des Testmaterials mit unterschiedlichen Puffern und Ionenstärken

Von den unten angegebenen Lösungen wurden 0,5 ml vorgegeben und mit jeweils 0,2 ml der DNA- oder Trypsintestlösung versetzt und nach 30 Minuten auf Trübung untersucht. Bei folgenden Puffern blieben beide Proben klar: 0,05 M Tris, PH 8,0. 0,05 M Tris; 0,5 NaCl; PH 8,0. 0,05 Tris; 2,0 NaCl; PH 8,0. 0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; PH 7,4. 0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; PH 8,0. 0,07 M Phosphat; PH 6,0. 0,1 M Phosphat; PH 6,0. 0,07 M Phosphat; 2,0 M Perchlorat; PH 6,0. 0,07 Phosphat; 2,0 M Guanidin; PH 6,0. 0,07 M Phosphat; 2,0 M Harnstoff; PH 6,0. 0,07 M Phosphat; 2,0 M NaCl; PH 6,0. 0,1 M Glycin; 0,5 M NaCl; PH 3,0. 0,1 M Glycin; 0,5 M Lysin; PH 3,0. 0,1 M Acetat; 0,5 M NaCl; PH 5,0. Mit Puffer 0,2 M Tris, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , PH 8,1, trat eine starke DNA-Ausfällung ein.

##### 4.2.14.2. Verträglichkeit des Testmaterials mit Affinitätsgelen

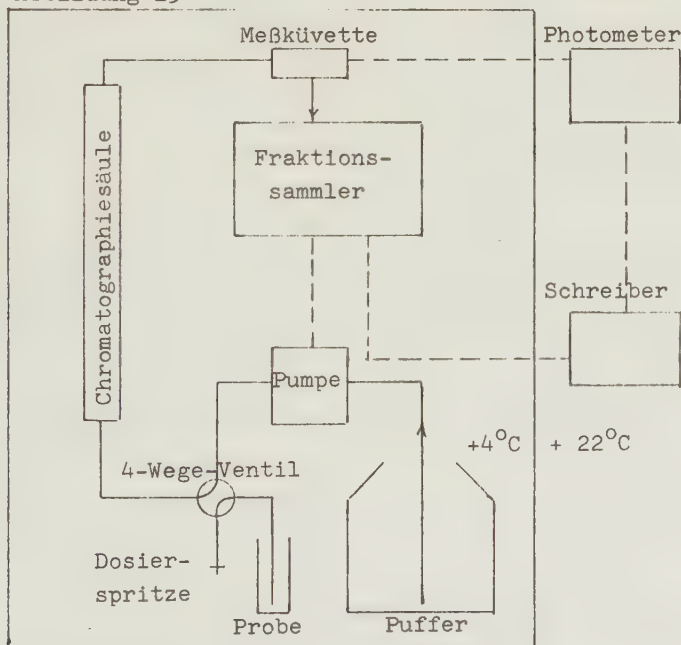
Zu 100  $\mu\text{l}$  des Affinitätsmaterials werden 5  $\mu\text{l}$  der Trypsin- oder DNA-Probe pipettiert und umgeschüttelt. Die Sepharose

mit gekuppeltem Ligand IV und Nr. 195 (s. Formelschema 5) fällt sofort nach DNA-Zugabe aus und läßt sich durch Schütteln nicht mehr suspendieren. Da bei späteren Chromatographieversuchen dauernd Störungen durch zu starke Bindungen, auch von Trypsin, auftraten, wurde mit diesem Material keine weiteren Versuche unternommen.

#### 4.2.14.3. Chromatographieanordnung

Die Geräteanordnung für die Affinitäts- und Gelchromatographie ist in Abbildung 23 skizziert.

Abbildung 23



Zur besseren Reproduzierbarkeit gleicher Chromatographien bei unterschiedlicher Flußrate wurde der Schreiber immer extern von der Pumpe angesteuert.

Folgende Geräteanordnung blieb bei allen Versuchen gleich:

Photometer: Transmission, Verstärkung 1 x, bei 280 nm und 254 nm; Schreiber: Steuerung extern, Papiervorschub = 1 mm/sec, Empfindlichkeit = 100 mV bei Kanal 1 und 2, 0-Linie bei 100 % Transmission. Fraktionssammler: Sammelart = Pumpenimpulse, Step delay = 70 Impulse.

Eine Eichung der Pumpe ergibt bei externer Steuerung: 100 ml Fraktionsvolumen = 70 cm Schreiberpapier = 14000 Impulse.

#### 4.2.14.4. Durchführung der Affinitätschromatographie

Die Sepharose wird in Puffer aufgeschlämmt und 15 Minuten im Wasserstrahlvakuum entgast und luftblasenfrei in eine Chromatographiesäule aus Glas (1,6 cm x 20 cm) gefüllt. Dann wird mit dem Puffer äquillibriert, in dem später die Probe aufgegeben werden soll. Es wird so lange mit Puffer gespült, bis das Photometer eine konstante Basislinie zeigt, mindestens aber mit dem Zweifachen des Gel-Bettvolumens.

Dann wird etwa 0,2 ml Probe über das Vierwegeventil mit einer Dosierspritze aufgegeben und mit Puffer solange äquillibriert, bis nach Erscheinen des Durchlaufpeaks die Basislinie wieder konstant ist. Nun können mit höherer Ionenstärke oder einer PH-Veränderung der von der Affinitätssäule gebundene Anteil abgelöst werden. Wenn diese Fraktion vollständig aufgefangen ist, wird solange mit dem ersten Puffer gewaschen, bis der Originalzustand der Säule wieder erreicht ist.

Nun kann eine neue Probe aufgegeben und wie oben weiter verfahren werden.

#### Chromatographie von Trypsin und DNA

Trypsin- und DNA-Lösungen wurden zuerst einzeln an den verschiedenen gekuppelten Liganden chromatographiert. Die Bindung von Trypsin gelang gut mit allen Amidinsäulen in unterschiedlichen Puffern. Um einen ungefähren Vergleich zwischen den einzelnen Materialien zu ermöglichen, wurde immer soviel

gleiches Volumen aufgegeben, daß ein Durchlaufpeak die Sättigung des Säulenmaterials anzeigte. Die Transmissionskurve des adsorbierten und dann wieder desorbierten Anteils wird planimetriert und auf ein Gramm Naßgewicht des Gels bezogen.

Dabei ergaben sich für die Benzamidin- und Indolamidin-Sephrose große Unterschiede: Während die Amidinbenzsepharose im alkalischen Puffer (0,05 M Tris, 0,5 M NaCl, PH 8,0) 207 Planimetereinheiten (PE) bindet, die Amidinindolsepharose dagegen nur 57 PE, sind die Verhältnisse bei saurer Chromatographie umgekehrt.

In 0,1 M Phosphatpuffer (PH 6,0) bindet die Amidinbenzsepharose nur noch 67 PE, die Amidinindolsepharose dagegen 146 PE.

Eine Diamidinindolsepharose, bei welcher der Ligand Nr. 65 mit der 3-Aminogruppe an Sepharose gekuppelt war, verhielt sich wie die Amidinindolsepharose: In Tris-Puffer bindet sie nur 45 PE, in Phosphat dagegen 112 PE. Die besseren Chromatographieeigenschaften in saurem Milieu sind wahrscheinlich an das Indolgrundgerüst gebunden. Der Vergleich zwischen den beiden Indolstrukturen zeigt weiter die Parallelität des *in-vitro*-Hemmtests und der Affinitätschromatographie: Die N-acylierten Verbindungen Nr. 68 und Nr. 48 unterscheiden sich in den Hemmkonstanten im gleichen Sinn, wie bei der Chromatographie. Das Monoamidin, in welchem der Indolkörper besser für die Trypsintasche zugänglich ist, hat eine höhere Bindungsaffinität als das sperrige, in 3-Stellung N-acylierte Produkt.

Die Ablösung des gebundenen Enzyms gelang durch Senkung des PH-Werts oder durch Erhöhung der Ionenstärke.

Für die Chromatographie mit Trypsin unter verschiedenen Bedingungen stehen also mehrere geeignete Moleküle zur Verfügung.

Die hauptsächliche Schwierigkeit des erwünschten Verfahrens ist die Chromatographie von DNA.

Auch hier funktionierte das theoretische Prinzip der Bindung an geschützte, kationische (= Imidazolinyll-) Gruppen gut. DNA konnte an beiden Liganden (I und III in Formelschema 5) mit unterschiedlichen Puffern gut gebunden werden. Die Bedingung

einer Indifferenz gegenüber einer Trypsinlösung wurde allerdings nur sehr schwer erfüllt. In fast allen Systemen, in welchen DNA gebunden wurde, blieb ebenfalls ein deutlicher Anteil Trypsin auf der Säule. Die IndolimidazolinyI-Säule bindet auch bei 2 M NaCl noch Trypsin.

Durch steigende Guanidin-Konzentrationen im Äquillibrierpuffer wird dieser Effekt zurückgedrängt, die Bindung von DNA gelingt dann aber ebenfalls nicht mehr.

Gleiche Ergebnisse brachten verschiedene Lysin-Puffer. Die Verwendung einer DNA ohne Äthylendiamitetraessigsäure lieferte gute Erfolge. Solche Proben wurden auf beiden Säulen etwa zehnfach besser adsorbiert als ein Material, welches diesen Komplexbildner enthielt.

Die ausschließliche Bindung von DNA gelang schließlich mit 0,1 M Phosphatpuffer (PH 6,0).

Trypsin passierte in diesem Milieu die Säule unbeeinflusst.

Es wurde nun eine Mischung aus gleichen Teilen einer DNA- und Trypsinlösung (beide gegen 0,1 M Phosphat, PH 6,0 dialysiert) hergestellt und über beide Säulen chromatographiert.

Dabei bestätigten sich die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche.

Die erste Säule mit dem BenzimidazolinyI-Liganden adsorbiert nur den DNA-Anteil, die zweite, Indolamidin-Säule das Trypsin. Die Identität der Proben wird durch UV-Messung und Biuret-Methode und bei Trypsin zusätzlich durch Aktivitätsbestimmung ermittelt.

Beide adsorbierten Anteile lassen sich durch gleichen Puffer mit zusätzlichem Perchlorat (0,8 M) ablösen.

Während Trypsin stark fixiert ist und auch durch hohe NaCl-Konzentrationen nicht abgelöst wird, desorbiert schon ein Pufferwechsel mit Tris (0,05 M, 0,5 NaCl, PH 8,0) die DNA von der ersten Säule.

Orientierende Versuche haben erwartungsgemäß gezeigt, daß die DNA-Probe unter obigen Bedingungen auch auf der Amidinsäule

festgehalten wird. Bei einer "proteinasensspezifischen" Chromatographie ist daher zu berücksichtigen, daß der erste Reinigungsschritt quantitativ erfolgen muß.

#### 4.2.15. Reinigung des Trypanosomenrohextrakts durch Gelchromatographie

Vor einer Auftrennung über Sephadex-G-100 wird ein nicht proteolytischer Anteil mit Benzamidin-Sepharose abgetrennt:

Das Gel wird gegen Puffer (0,05 M Tris, 0,5 M NaCl, PH 8,0) äquilibriert und mit 0,2 ml eines Trypanosomenrohextrakts beschickt. Mit obigem Puffer wird die Säule nun bei einer Flußgeschwindigkeit von 15 ml/Stunde (2100 Imp.) gewaschen. Der nicht adsorbierte Anteil, der die gesamte Aktivität enthält, erscheint nach 4 ml. Die aktiven Fraktionen werden gesammelt. Nach Erreichen der Basislinie wird der gebundene Anteil durch Phosphatpuffer (0,1 M, 0,5 M NaCl, PH 3,0) abgelöst. Nachdem die Säule wieder mit Anfangspuffer äquilibriert ist, kann eine neue Probe aufgegeben werden.

##### 4.2.15.1. Gelchromatographie mit Sephadex G-100

Entgaste Sephadex-G-100-Suspension wird in eine Chromatographiesäule (1,6 cm x 20 cm) gefüllt und mit 0,05 M Tris, 0,5 M NaCl (PH 8,0) gewaschen.

0,5 ml der angereicherten Probe werden aufgegeben und mit obigem Puffer bei einer Flußrate von 10 ml/Std. chromatographiert. Es erscheinen nach 10 ml drei Peaks, von denen der erste die Aktivität enthält. Die Fraktionen des ersten Peaks (Absorption: 254 nm, 43 %), des zweiten (nach 18 ml, A: 29 %) und dritten (nach 24 ml, A: 21 %) werden getrennt gesammelt.

Bei sieben Trennungen fielen bei Peak 1 60 ml, bei Peak 2 und 3 je 100 ml Elutionsvolumen an, die alle mit einer PM-10-Membran auf 3 ml angereichert wurden.

Alle drei Proben werden mit L-Bapa (s. Kapitel 4.2.5.3.) und den K a b i - Substraten (s. Kapitel 4.2.5.5.) untersucht:

Nur die erste Fraktion zeigte Aktivität. Im L-Bapa-Test: 0,11 U/ml angereicherter Probelösung.

Bei den K a b i - Substraten mit S-2251 = 44 mU/ml, S-2222 = 31 mU/ml, S-2302 = 48 mU/ml und S-2238 = 11 mU/ml.

Die prozentualen Spaltungsraten dieser Probe wurden viermal ermittelt: (IV in Abbildung 9).

S-2251 : 84 %  $\pm$  7 % , S-2302 : 100 %

S-2222 : 60 %  $\pm$  3 % , S-2238 : 24 %  $\pm$  1 %.

#### 4.2.15.2. Hemmung durch unterschiedliche Inhibitoren

Im Testansatz von Kapitel 4.2.5.5. werden 13  $\mu$ g/ml Testlösung Antipain, Sojabohnentrypsininhibitor und Trasylol<sup>R</sup> und  $2 \times 10^{-5}$ M der Verbindungen 20, 23 und 24 inkubiert.

|                        |     |          |       |                       |        |        |             |
|------------------------|-----|----------|-------|-----------------------|--------|--------|-------------|
| Inhibitor:             | --- | Antipain | STI   | Trasylol <sup>R</sup> | Nr. 20 | Nr. 23 | Nr. 24      |
| $\Delta E/\text{Min.}$ | :   | 0,059    | 0,001 | 0,027                 | 0,059  | 0,058  | 0,056 0,059 |

Die Anreicherung des dritten Peaks wird in steigenden Mengen im Trypsin-Hemmansatz (von Kapitel 4.1.) als Inhibitor eingesetzt.

|                        |      |        |        |        |             |
|------------------------|------|--------|--------|--------|-------------|
| Inhibitor:             | ---- | 0,1 ml | 0,2 ml | 0,3 ml | 0,4 ml      |
| $\Delta E/\text{Min.}$ | :    | 0,110  | 0,037  | 0,037  | 0,047 0,058 |

#### 4.2.16. Reinigung des Trypanosomenrohextrakts durch Affinitätschromatographie

##### 4.2.16.1. Chromatographie mit Imidazolinbenzsepharose

Vor einer Chromatographie mit der Amidinindolsepharose wird ein nicht proteolytischer Anteil durch BenzimidazolinyI-Sepharose abgetrennt.

Die Imidazolinbenzsepharose wird in 0,1 M Phosphatpuffer (PH 6,0) suspendiert und in eine kleine Glassäule (1,6 cm x 20 cm) gefüllt und mit Puffer äquilibriert.

Der frisch bereitete Trypanosomenrohextrakt enthält 8,16 mg Protein/ml und hat im L-Bapa-Test eine Aktivität von 33 mU/mg. Die Probe wird gegen Phosphatpuffer dialysiert und mit einer Flußrate von 15 ml/Std. über die Säule chromatographiert.

Die absorbierten Fraktionen des nach 4 ml erscheinenden Peaks A werden in einem Sammelgefäß aufgefangen. Nach Erreichen der 0-Linie wird mit einem zweiten Puffer eluiert (0,05 M Tris, 0,5 M NaCl, PH 8,0). Der von der Säule desorbierte Anteil wird in einem zweiten Gefäß gesammelt (Peak B). Die Säule wird nun wieder mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und von neuem mit Probe beladen. Um die Kapazität der Säule voll auszuschöpfen, wird immer die gesamte Probenmenge chromatographiert. Der Adsorptions- und Desorptionsvorgang wird so oft wiederholt, bis bei der Tris-Elution kein Peak mehr erscheint.

Beide Proben werden mit einer PM-10-Membran angereichert. Für Aktivitätsversuche werden jeweils 2 ml abgetrennt und gegen 0,05 M Tris-Puffer (PH 8,0) dialysiert.

Peak A: Kombinerter Aktivitäts- und Hemmansatz mit K a b i - Substraten.

Inhibitor: 6,6 µg Trasylol<sup>R</sup> in 0,05 ml (s. Kapitel 4.2.5.7.).

| Substrat          | S-2251 | S-2222 | S-2302 | S-2266 |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|
| Spaltungsrate     | 61 %   | 49 %   | 90 %   | 100 %  |
| ΔE/Min.(o.Inhib.) | 0,037  | 0,030  | 0,055  | 0,061  |
| ΔE/Min.(m.Inhib.) | 0,033  | 0,026  | 0,047  | 0,054  |

Die Probe enthält 1,4 mg Protein pro ml und hat im L-Bapa-Test eine Aktivität von 26 mU/mg Protein.

Peak B: Keinerlei Aktivität in beiden Testen.

#### 4.2.16.2. Gelchromatographie mit Sephadex-G-200

Die entgaste Sephadex-G-200-Suspension in 0,05 M Tris-Puffer, PH 8,0, wird in eine Glassäule (1,6 cm x 50 cm) gefüllt und mit gleichem Puffer gewaschen.

Nach Probenaufgabe wird mit einer Flußrate von 3 ml/Std. chromatographiert und Fraktionen von 2,85 ml gesammelt. Als Probe werden 2 ml des angereicherten Peaks A aufgegeben. Nach 14 ml erscheinen drei flache Peaks, von denen der zweite die Aktivität beinhaltet. Die aktiven Fraktionen werden gesammelt und mit einer PM-10-Membran angereichert. Fraktion 11 enthielt 0,094 mg Protein/ml und hatte im L-Bapa-Test eine Aktivität von 51 mU/mg. Im Aktivitäts- und Hemmansatz mit den K a b i - Substraten konnten 2 µg DAPI in 0,1 ml die Reaktion nicht hemmen, ebenso haben 40 und 75 mM Ca<sup>2+</sup> keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei Substrat S-2222.

Relative Spaltungsraten:

S-2251 (61 %), S-2222 (50 %), S-2302 (95 %), S-2266 (100 %).

Als Vergleich wurden 1 ml des Rohextrakts über die gleiche Säule chromatographiert.

#### 4.2.16.3. Chromatographie mit Amidinindolsepharose

Die Sepharose wird in 0,1 M Phosphat-Puffer (PH 6,0) suspendiert und in eine Glassäule (1,6 cm x 20 cm) gefüllt und mit Puffer äquilibriert.

Als Probe wird direkt die angereicherte, aktive Fraktion der Chromatographie über Imidazolinbenzsepharose eingesetzt. Das gesamte Volumen von 40 ml wird in einem Arbeitsgang mit einer Flußgeschwindigkeit von 3 ml/Std. über die Säule gegeben. Es

werden Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen. Nach 3 ml erscheint ein breiter Peak (A) mit einem Volumen von 20 ml, welches vereint und mit einer PM-10-Membran angereichert wurde.

Nach einem Durchfluß von 5 ml wird die Chromatographie unterbrochen und mit einem ionenstarken Puffer (0,1 M Phosphat, 0,8 M Perchlorat, PH 6,0) eluiert. Nach 2 ml erscheint eine Fraktion mit Schulter und einem Gesamtvolumen von 13 ml (Peak B).

Beide Proben werden angereichert und gegen 0,05 M Tris-Puffer dialysiert und Aktivität und Hemmbarkeit untersucht.

Peak A: Im L-Bapa-Test und mit K a b i - Substraten keine Aktivität.

Peak B:

Die Probe enthält 0,465 mg Protein/ml.

Im L-Bapa-Test haben 0,05 ml Probe eine Aktivität von  $\Delta E/\text{Min} = 0,0162$ , das entspricht einer spezifischen Aktivität von 120 mU/mg.

Kombinierter Aktivitäts- und Hemmansatz mit K a b i - Substraten.

Inhibitor: 7  $\mu\text{g}$  Sojabohnentrypsininhibitor in 0,05 ml (Volumenfehler 6,6 %), Proteinase 0,05 ml.

| Substrat                           | S-2251 | S-2222 | S-2302 | S-2266 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Spaltungsrate                      | 63 %   | 44 %   | 93 %   | 100 %  |
| $\Delta E/\text{Min. (o. Inhib.)}$ | 0,027  | 0,019  | 0,040  | 0,043  |
| $\Delta E/\text{Min. (m. Inhib.)}$ | 0,018  | 0,016  | 0,033  | 0,033  |
| Hemmung -                          | 26 %   | 9 %    | 10 %   | 16 %   |
| Volumenfehler                      |        |        |        |        |

Inhibitor: 0,1 ml DAPI, Küvettenkonz.:  $7,6 \times 10^{-6}$  M (Volumenfehler 13 %), 0,1 ml Proteinase.

|                                    |        |        |        |        |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Substrat                           | S-2251 | S-2222 | S-2302 | S-2266 |
| Spaltungsrate                      | 63 %   | 47 %   | 86 %   | 100 %  |
| $\Delta E/\text{Min. (o. Inhib.)}$ | 0,055  | 0,041  | 0,076  | 0,088  |
| $\Delta E/\text{Min. (m. Inhib.)}$ | 0,048  | 0,036  | 0,065  | 0,076  |
| Hemmung -                          | --     | --     | --     | --     |
| Volumenfehler                      |        |        |        |        |

4.2.16.4. Hemmung durch DAPI, STI, Antipain und Trasylol<sup>R</sup> mit Substrat S-2266

Im Testansatz von Kapitel 4.2.5.5. werden die Inhibitoren in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

DAPI: 10  $\mu\text{g/ml}$ , STI, Trasylol<sup>R</sup>: 270  $\mu\text{g/ml}$ , Antipain: 27  $\mu\text{g/ml}$ .

|                        |       |       |       |                       |          |
|------------------------|-------|-------|-------|-----------------------|----------|
| Inhibitor              | ---   | DAPI  | STI   | Trasylol <sup>R</sup> | Antipain |
| $\Delta E/\text{Min.}$ | 0,058 | 0,057 | 0,036 | 0,046                 | 0,007    |
| Hemmung                | 0 %   | 0 %   | 39 %  | 21 %                  | 87 %     |

4.2.16.5. Hemmung durch steigende Antipain-Konzentrationen

Im obigen Testansatz werden mehrere Antipain-Konzentrationen eingesetzt:

|                                         |     |       |      |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------|-----|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Testkonz. $\mu\text{g/ml}$ :            | 0   | 0,014 | 0,14 | 1,1 | 1,7 | 2,3 | 2,9 | 5,7 | 8,6 |
| $\Delta E/\text{Min.} \times 10^{-3}$ : | 32  | 16    | 8    | 3   | 2   | 2   | 1   | 0,7 | 0,5 |
| Hemmung                                 | :0% | 50%   | 75%  | 91% | 94% | 94% | 97% | 98% | 99% |

4.2.16.6. Gelchromatographie mit Sephadex-G-75

Das Gel wird in 0,1 M Tris, PH 8,0, suspendiert in eine Glas-säule (1,6 cm x 20 cm) gefüllt und mit Puffer äquilibriert.

1,5 ml der über Amidinindolsepharose gereinigten Probe wird aufgetragen und mit einer Flußrate von 2 ml/Std. chromatografiert. Es werden Fraktionen zu 1,5 ml gesammelt.

Die Registrierung der Absorption bei 280 nm erfolgt mit 10-facher Verstärkung.

Nach 4,5 ml erscheinen vier Peaks, die nicht voneinander getrennt werden. Die hauptsächliche Aktivität ist im zweiten Peak lokalisiert. Die Fraktion 8 dieses Peaks wird als Probe in untenstehenden Testen eingesetzt. Im zweiten Peak ist auch noch eine geringere Aktivität zu finden. Die Fraktion 11 dieses Peaks wird ebenfalls untersucht. Die Fraktionen 3 - 5 und 14 - 17 enthalten keinerlei Aktivität.

#### Fraktion 8:

Die Probe enthält 0,01 mg Protein/ml und hat eine spezifische Aktivität im L-Bapa-Test von 540 mU/mg.

Im kombinierten Aktivitäts- und Hemmansatz (s. Kapitel 4.2.5.7.) werden 5 µg DAPI in 0,1 ml als Inhibitor eingesetzt. 0,2 ml Probe.

| Substrat             | S-2251 | S-2222 | S-2302 | S-2266 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| Spaltungsraten       | 83 %   | 50 %   | 100 %  | 82 %   |
| ΔE/10 Min.(o.Inhib.) | 0,113  | 0,068  | 0,136  | 0,111  |
| ΔE/10 Min.(m.Inhib.) | 0,036  | 0,035  | 0,075  | 0,053  |
| Hemmung -            | 55 %   | 37 %   | 32 %   | 39 %   |
| Volumenfehler        |        |        |        |        |

#### Fraktion 11:

Die Probe enthält 0,01 mg Protein/ml.

Im kombinierten Aktivitäts- und Hemmansatz mit den K a b i - Substraten werden 5 µg DAPI in 0,1 ml zugegeben (Volumenfehler 13 %), 0,2 ml Probe.

| Substrat            | S-2251 | S-2222 | S-2302 | S-2266 |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|
| Spaltungsraten      | 83 %   | 52 %   | 100 %  | 99 %   |
| E/10 Min.(o.Inhib.) | 0,039  | 0,024  | 0,047  | 0,046  |
| E/10 Min.(m.Inhib.) | 0,030  | 0,023  | 0,047  | 0,040  |
| Hemmung -           | 10 %   | ---    | ---    | ---    |
| Volumenfehler       |        |        |        |        |

#### 4.2.17. Anreicherung

Vor einer Weiterverarbeitung wurden alle Chromatographiefraktionen angereichert und gegebenenfalls dialysiert. Zur Anreicherung wurde eine A m i c o n 8-MC-Zelle mit unterschiedlichen Membranen benutzt.

Die Anreicherung wird unter langsamen Rühren und einem Stickstoffdruck von 4 atü im KÜHLSCHRANK bei  $+4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Das Filtrat wird immer aufgefangen, auf Restaktivität untersucht und bei Bedarf nochmals über eine kleinere Porengröße filtriert.

In den meisten Fällen genügte die PM-10-Membran, die eine etwa zehnfach höhere Flußgeschwindigkeit erlaubt als die UM-05- oder UM-10-Membran.

Bei einer Anreicherung mit der PM-10-Membran ergibt sich ein Verlust von etwa 20 Prozent. Trypanosomenrohextrakte sollen konzentriert hergestellt werden, da eine Anreicherung dieses Materials einen großen Verlust (bis 70 %) fordert.

#### 4.2.18. Dialyse

Kleine Mengen (bis 8 ml) können in der Amicon-Zelle dialysiert werden. Die Probe befindet sich in der Anreicherungskammer, der Dialysierpuffer in dem Reservoir. Große Volumina einer Chromatographiefraktion werden in einem Arbeitsgang angereichert und dialysiert.

Die Probe wird in die Anreicherungs- und Vorratskammer gefüllt und so lange angereichert, bis die Anreicherungskammer das Gesamtvolumen beinhaltet. Die Verbindung zum Reservoir wird unterbrochen und die Vorratskammer durch mehrmaliges Ausspülen gereinigt und mit 100 ml Dialysierpuffer beschickt.

Größere Mengen werden in einem Visking Dialysierschlauch äquilibriert. Die Ausschlußgrenze der Folie liegt bei  $24 \text{ \AA}$ . Der Schlauch wird vor Benutzung in destilliertem Wasser und anschließend dem Dialysierpuffer ausgekocht.

#### 4.2.19. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach zwei Methoden:

Nicht gereinigtes Material mit hoher Eiweißkonzentration wird nach der **B i u r e t** - Methode bestimmt <sup>145)</sup>.

Dazu wird jede Probe vor der Bildung des Farbkomplexes mit Trichloressigsäure ausgefällt.

Geringe Proteinkonzentrationen gereinigter Proben wurden durch UV-Messung bei 280 nm bestimmt.

Die Methode wird nur angewendet, wenn das Absorptionsmaximum der Probe eindeutig bei 280 nm lag.

Für eine Messung in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke wird  $E_{280\text{ nm}}^{1\%} = 11,0$  als Bezugsgröße benutzt.

Der Wert wurde aus einer Eichkurve ermittelt, die sich unter gleichen Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen einer  $\gamma$ -Globulinlösung aus Rinderserum ergab.

$\gamma$ -Globulin aus Rinderserum, gelöst in Wasser;

Photometer: DMR 21, kontinuierliche Aufzeichnung des UV-Spektrums zwischen 330 nm und 250 nm bei einfacher und zehnfacher Verstärkung; Messung gegen Wasser.

| Protein<br>$\mu\text{g/ml}$ | E bei<br>280 nm | Verst. | Protein<br>$\mu\text{g/ml}$ | E bei<br>280 nm | Verst. |
|-----------------------------|-----------------|--------|-----------------------------|-----------------|--------|
| 2,5                         | 0,0055          | x 10   | 100                         | 0,105           | x 1    |
| 7,5                         | 0,0100          | x 10   | 150                         | 0,165           | x 1    |
| 10                          | 0,0125          | x 10   | 200                         | 0,220           | x 1    |
| 15                          | 0,0180          | x 10   | 250                         | 0,270           | x 1    |
| 20                          | 0,0230          | x 10   | 500                         | 0,545           | x 1    |
| 25                          | 0,0285          | x 10   | 1000                        | 0,950           | x 1    |
| 50                          | 0,0565          | x 10   |                             |                 |        |
| 75                          | 0,0820          | x 10   |                             |                 |        |
| 100                         | 0,1500          | x 10   |                             |                 |        |

Bei einer zehnfachen Verstärkung ergibt sich eine strenge Linearität zwischen 7,5  $\mu\text{g/ml}$  - 75  $\mu\text{g/ml}$  bei einfacher Verstärkung zwischen 100  $\mu\text{g/ml}$  - 500  $\mu\text{g/ml}$ .

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1) R.F. Macadam und J. Williamson, Ann. Trop. Med. Parasitol. 68, Nr. 2, 291 (1974)
- 2) W.E. Ormerod und J.J. Shaw, Br. J. Pharmacol. 21, 259 (1963) ref. bei 1)
- 3) W. Fuller und M.J. Waring, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 68, 805 (1964)
- 4) B.A. Newton, Biochem. J. 105, 50 (1967)
- 5) M. Steinert, Exp. Cell Res. 39, 69 (1965) ref. bei C.M. Kleisen, P. Borst und P.J. Weijers, Eur. J. Biochem. 64, 473 (1975)
- 6) R.F. Macadam und J. Williamson, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 897 (1972)
- 7) J. Williamson, Trop. Dis. Bull. 73, 531 (1976)
- 8) E.F. Gale, E. Cundcliffe, P.F. Reynolds, M.H. Richmond und M.J. Waring, in: The Molecular Basis of Antibiotic Action (J. Wiley ed.) London, New York, Sidney Toronto (1972)
- 9) J.D. Geratz, Experientia 25, 1254 (1969)
- 10) J.D. Geratz, in: Pulmonary Emphysema and Proteolysis, 325 Academic Press, Inc., New York and London 1972
- 11) J.D. Geratz und W.P. Webster, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 194, Nr. 2, 359-370 (1971)
- 12) J.D. Geratz, Folia Haematol., Leipzig 98, Nr. 4, 455-470 (1972)
- 13) J.D. Geratz, Thromb. Diath. Haemorrh. 24, 455-470 (1972)
- 14) W.-D. Schleuning, H. Schiessler und H. Fritz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 550-554 (1973)
- 15) H. Schiessler, W.-D. Schleuning und H. Fritz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1931-1936 (1975)

- 16) L.J.D. Zanaveld, K.L. Polakoski, R.T. Robertson und W.L. Williams in: Proceedings on the International Reasearch Conference on Proteinaseinhibitors (H. Fritz und H. Tschesche eds.) 236-244, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York 1971
- 17) B.F. Schumacher, J.R. Swartwout und F.P. Zuspan in: Proceedings on the International Reasearch Conference on Proteinaseinhibitors (H. Fritz und H. Tschesche eds.) 247-252, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York 1971
- 18) K.L. Polakoski und W.L. Williams in: Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors" (H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene und E. Truscheit eds.) 156-163, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1974
- 19) H. Fritz, persönliche Mitteilung
- 20) R.F. Parrish, J.W. Straus, J.D. Paulson, K.L. Polakoski, R.R. Tidwell, J.D. Geratz und F.M. Stevens, J. Med. Chem. 21, 1132-1136 (1978)
- 21) J. Stürzebecher und F. Markwardt, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 25-29 (1980)
- 22) R.R. Tidwell, J.D. Geratz, O. Dann, G. Volz, D. Zeh und H. Loewe, J. Med. Chem. 21, 613-623 (1978)
- 23) W.E. Ormerod in: The African Trypanosomiasis (Col. H.W. Mulligan ed.) 587-601, Unwin Ltd., London 1970
- 24) G. Kreil, Biologie in unserer Zeit, 9, Nr. 5, 141-146 (1979)
- 25) G.E. Palade, Science 189, 347-358 (1975)
- 26) H. Neurath und K.A. Walsh, in: Proteolysis and Physiological Regulation (D.W. Ribbons und K. Brew eds.) 29-42, Academic Press Inc., New York San Francisco London 1976
- 27) E.W. Davie, K. Fujikawa, K. Kurachi, T. Koide und W. Kisiel, in: Proteolysis and Physiological Regulation (D.W. Ribbons und K. Brew eds.) 189-201 Acad. Press Inc., New York San Francisco London 1976

- 28) J. Stenflo, P. Fernlund, W. Egan und P. Roepstorff, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 2730 (1974) ref. bei 27)
- 29) S. Magnusson, L. Sottrup-Jensen, T.E. Petersen, H.R. Morris und A. Dell, *FEBS Lett.* 44, 189 (1974) ref. bei 27)
- 30) G.L. Nelsestuen, T.H. Zytkoviez und J.B. Howard, *J. Biol. Chem.* 249, 6347 (1974) ref. bei 27)
- 31) W. Bode, *Naturwissenschaften* 66, 251-258 (1979)
- 32) R. Acher, *Angew. Chem.* 86, 209 (1974)
- 32a) L.A. Cohen, in: *The Enzymes*, Vol. I, (P.D. Boyer ed.) 147-211, Academic Press New York London 1970
- 33) C.G. Knight, in: *Proteinases in mammalian cells and tissues* (A.J. Barrett ed.) 583-636, North-Holland Publishing Company Amsterdam New York Oxford 1977
- 34) G.F.B. Schumacher und W.B. Schill, *Anal. Biochem.* 48, 9 (1972) ref. bei 33)
- 35) N. Heimburger, in: *Die Rolle der Blutplättchen bei der Thrombose* (E.F. Lüscher ed.) 103-115, F.K. Schattauer Verlag Stuttgart New York 1976
- 36) H. Schiessler, M. Arnold und H. Fritz, in: *Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors"* (H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene und E. Truscheit eds.) 104-115, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1974
- 37) G.F.B. Schumacher und L.J.D. Zaneveld, in: *Bayer-Symposium V "Proteinase-Inhibitors"* (H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene und E. Truscheit eds.) 178-186, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1974
- 38) H. Fritz, F. Woitinas und E. Werle, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 345, 168-180 (1966)
- 39) K. Hochstrasser, H. Feuth und K. Hochgesand, in: *Bayer-Symposium V "Proteinase-Inhibitors"* (H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene und E. Truscheit eds.) 111-116, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1974
- 40) M. Kunitz und J.H. Northrop, *J. Gen. Physiol.* 19, 991 (1936)

- 41) O. Dann, E. Schmidt und W. Schwarzenborfer, Pharmazie in unserer Zeit 6, 31-41 (1977)
- 42) H. Umezawa, Acta Biol. Med. Ger. 36, 1899-1915 (1977)
- 43) H. Umezawa und T. Aoyagi, in: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J. Barrett ed.) 637-662, North-Holland Publishing Company Amsterdam New York Oxford 1977
- 44) H. Fritz, B. Förg-Brey und H. Umezawa, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. 354, 1304-1306 (1973)
- 45) W. Windinger, in: Bayer-Symposium V "Proteinase-Inhibitors" (H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene und E. Truscheit eds.) 548-559, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1974
- 46) G. Claeson, L. Aurell, G. Karlsson, S. Gustavsson, F. Friberger, S. Arielly und R. Simonsson, in: Chromogenic Peptide Substrates (M.F. Scully und V.V. Kakkar eds.) 20-31 Churchill Livingstone Edinburgh London New York 1979
- 47) G. Schoelmann und E. Shaw, Biochemistry 2, 252 (1963)
- 48) E. Shaw, M. Mares-Guia und W. Cohen, Biochemistry 4, Nr. 10, 2219-2224 (1965)
- 49) M. Mares-Guia und E. Shaw, J. Biol. Chem. 242, Nr. 24, 5782-5788 (1967)
- 50) T. Chase und E. Shaw, Biochemistry 8, Nr. 5, 2212-2224 (1969)
- 51) F. Markwardt, P. Walsmann, J. Stürzebecher, H. Landmann und G. Wagner, Pharmazie 28, Nr. 5, 326-330 (1973)
- 52) H. Mix, H.-J. Trettin und M. Gülzow, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1237-1238 (1968)
- 53) F. Markwardt, H. Landmann und P. Walsmann, Eur. J. Biochem. 6, 502-506 (1968)
- 54) P. Walsmann, H. Horn, H. Landmann, F. Markwardt, J. Stürzebecher und G. Wagner, Pharmazie 30, Nr. 6, 386-389 (1975)

- 55) P. Walsmann, H. Horn, F. Markwardt, P. Richter, J. Stürzebecher, H. Vieweg und G. Wagner, Acta Biol. Med. Ger. 35, K1-K8 (1976)
- 56) P. Walsmann, F. Markwardt, J. Stürzebecher, B. Voigt und G. Wagner, Pharmazie 33, Nr. 11, 760-761 (1978)
- 57) J.D. Geratz, R.R. Tidwell, K.M. Brinkhous, S.F. Mohammad, O. Dann und H. Loewe, Thromb. Diath. Haemorrh. 39, Nr. 2, 411-425 (1978)
- 58) J.D. Geratz, M. C.-F. Cheng und R.R. Tidwell, J. Med. Chem. 19, Nr. 5, 634-639
- 59) J.D. Geratz, A.C. Whitmore, M. C.-F. Cheng und C. Piantadosi, J. Med. Chem. 16, Nr. 9, 970-975 (1973)
- 60) J.D. Geratz, M. C.-F. Cheng und R.R. Tidwell, J. Med. Chem. 18, Nr. 5, 477-481
- 61) J.D. Geratz, persönliche Mitteilung
- 62) N. Heimbürger, persönliche Mitteilung
- 63) O. Dann, G. Volz, E. Demant, W. Pfeifer, G. Bergen, H. Fick und E. Walkenhorst, Justus Liebigs Ann. Chem. 1112-1140 (1973)
- 64) H. Char, Dissertation, Erlangen 1978
- 65) O. Dann, E. Hieke, H. Hahn, H.-H. Miserre, G. Lürding und R. Rößler, Justus Liebigs Ann. Chem. 734, 23-45 (1970)
- 66) O. Dann, G. Bergen, E. Demant und G. Volz, Justus Liebigs Ann. Chem. 749, 68-89 (1971)
- 67) O. Dann, R. Fernbach, W. Pfeifer, E. Demant, G. Bergen, S. Lang und G. Lürding, Justus Liebigs Ann. Chem. 760, 37-87 (1972)
- 68) O. Dann, H. Fick, B. Pietzner, E. Walkenhorst, R. Fernbach und D. Zeh, Justus Liebigs Ann. Chem. 160-194 (1975)
- 69) W. Stich, Dissertation in Vorbereitung
- 70) G. Volz, persönliche Mitteilung
- 71) D. Zeh, Dissertation, Erlangen 1975

- 72) H. Fick, Dissertation, Erlangen 1971
- 73) R. Schlee, Dissertation in Vorbereitung
- 74) R. Holzheid, Dissertation in Vorbereitung
- 75) H. Griebmeier, Dissertation, Erlangen 1979
- 76) G. Bergen, Dissertation, Erlangen 1968
- 77) G. Lürding, Dissertation, Erlangen 1968
- 78) W. Pfeifer, Dissertation, Erlangen 1970
- 79) E. Brengel, Dissertation in Vorbereitung
- 80) G. Schäfer, Dissertation, Erlangen 1977
- 81) R. Fernbach, Dissertation, Erlangen 1969
- 82) G. Kaliwoda, Dissertation, Erlangen 1976
- 83) E. Walkenhorst, Dissertation, Erlangen 1970
- 84) J. Ruff, Dissertation, Erlangen 1979
- 85) H.P. Wolff, Dissertation, Erlangen 1977
- 86) W. Steuding, persönliche Mitteilung
- 87) R. Schmalzbauer, Dissertation in Vorbereitung
- 88) G. Schürger, Dissertation in Vorbereitung
- 89) Lisson, Dissertation, Erlangen 1974
- 90) P. Fleischmann, Dissertation in Vorbereitung
- 91) G. Harbaum-Neuhaus, Laborjournal 273
- 92) M. Salvajoli, persönliche Mitteilung
- 93) E. Demant, Dissertation, Erlangen 1968
- 94) J. Ruff, persönliche Mitteilung
- 95) B. Pietzner, Dissertation, Erlangen 1972
- 96) M. Dixon, Biochem. J. 55, 170-171 (1953)
- 97) F. Markwardt, P. Richter, J. Stürzebecher, G. Wagner und  
P. Walsmann, Acta Biol. Med. Ger. 33, K1-K7 (1974)
- 98) J. Stürzebecher, F. Markwardt, B. Voigt, P. Walsmann und  
G. Wagner, Pharmazie 31, Nr. 12, 886-888 (1976)

- 99) P. Walsmann, F. Markwardt, J. Stürzebecher und G. Wagner, Pharmazie 34, Nr. 3, 183-185 (1979)
- 100) P. Walsmann, F. Markwardt, P. Richter, J. Stürzebecher, G. Wagner und H. Landmann, Pharmazie 29, Nr. 5, 333-338 (1974)
- 101) G. Minet, Dissertation, Erlangen 1980
- 102) E. Fink, persönliche Mitteilung
- 103) J.M. Bafort, persönliche Mitteilung
- 104) H. Fritz, I. Trautschold und E. Werle, in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer ed.) 1105-1122, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße 1974
- 105) F.R. Oppendoes und P. Borst, FEBS Letters 80, Nr. 2, 360 (1977)
- 106) R.F. Steiger, F.R. Oppendoes und J. Bontemps, Eur. J. Biochem. 105, 163-175 (1980)
- 107) Al Chalabi und W.E. Gutteridge, Biochim. Biophys. Acta 481, 71-79 (1977)
- 108) R.D. Walter, Biochim. Biophys. Acta 429, 137-146 (1976)
- 109) R.D. Walter und F. Ebert, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 23-26 (1977)
- 110) B.R. Martin, H.P. Voorheis und E. Kennedy, Biochem. J. 175, 207-212 (1978)
- 111) V. Kilgour und D.G. Godfrey, Nature New Biology 244, 69-70 (1973)
- 112) S. Itow und E.P. Camargo, Protozool. 24, Nr. 4, 591-595 (1977)
- 113) V. Bogertz und K.D. Hungerer, Exp. Parasitol. 45, 8-18 (1978)
- 114) J.L. Avila, M.A. Casanova, A. Avila und A. Bretana, J. Protozool. 26, Nr. 2, 304-311 (1979)
- 115) S.G. Lanreth und A.E. Balber, J. Protozool. 22, Nr. 1, 40-53 (1975)

- 116) J.M. Jadin und J. Creemers, Arch. Int. Physio. Biochim. 78, 1001 (1970) ref. bei 106)
- 117) J.R. Seed, J. Byram und A.A. Gam, J. Protozool. 14, 117 (1967) ref. in 106)
- 118) Y. Nakano, Y. Sudate und S. Kitaoka, Agric. Biol. Chem. 43, Nr. 2, 223-229 (1979)
- 119) E. Bülbring, E.M. Lourie und U. Pardoe, Brit. J. Pharmacol. 4, 290-294 (1949)
- 120) S. Venkatesan, R.G. Bird und W.E. Ormerod, Int. J. Parasitol. 7, 139-147 (1977)
- 121) D.A. Evans und D.S. Ellis, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, Nr. 6, 653-655 (1978)
- 122) D.S. Ellis und D.A. Evans, Nature 267, 834 (1977) ref. bei 121)
- 123) J. Mc. Laughlin und M. Müller, J. Biol. Chem. 254, Nr. 5, 1526-1533 (1979)
- 124) A.J. Barrett, in: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J. Barrett ed.) 181-208, North-Holland Publishing Company Amsterdam New York Oxford (1977)
- 125) E. Davidson und B. Poole, Biochim. Biophys. Acta 397, 437 (1975) ref. bei 124)
- 126) J.M.W. Bouma und M. Gruber, Biochim. Biophys. Acta 113, 350 (1966) ref. bei 124)
- 127) M.C. Burleigh, A.J. Barrett und G.S. Lazarus, Biochem. J. 137, 387 (1974) ref. bei 124)
- 128) K.J.J. Thorne, R.C. Williams und A.J. Barrett, Infect. Immun. 14, 555 (1976) ref. bei 124)
- 129) A.J. Barrett, in: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J. Barrett ed.) 1-55, North-Holland Publishing Company Amsterdam New York Oxford (1977)
- 130) P.F.L. Boreham, Br. J. Pharmacol. Chemother. 32, 493-504 (1968)

- 131) P.F.L. Boreham, Br. J. Pharmacol. 34, 598-603 (1968)
- 132) P.F.L. Boreham und I.G. Wright, Br. J. Pharmacol. 58, 137-139 (1976)
- 133) I.G. Wright und P.F.L. Boreham, Biochem. Pharmacol. 26, 417-423 (1977)
- 134) P.F.L. Boreham, Ann. Soc. belge Méd. trop. 57, Nr. 4-5, 249-252 (1977)
- 135) P.F.L. Boreham und C.A. Facer, Z. Parasitenk. 52, 257-265 (1977)
- 136) P.F.L. Boreham und C.A. Facer, Int. J. Parasitol. 4, 143-151 (1974)
- 137) D.F. Steiner, W. Kemmler, H.S. Tager und J.D. Peterson, Fed. Proc. 33, 2105 (1974) ref. bei 124)
- 138) H.-W. Denker und H. Fritz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 107-113 (1979)
- 139) S.M. Lanham und D.G. Godfrey, Exp. Parasitol. 28, 521-534 (1975)
- 140) H. Fritz, persönliche Mitteilung
- 141) I. Trautschold, E. Werle und G. Schweitzer, in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer ed.) 1071-1080, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1974
- 142) P. Friberger und M. Knös, in: Chromogenic Peptide Substrates (M.F. Scully und V.V. Kakkar eds.) 128-140, Churchill Livingstone Edinburgh London New York 1979
- 143) E.P. Camargo, S. Itow und S.C. Alfieri, J. Parasitol. 64, Nr. 6, 1120-1121 (1978)
- 144) W.D. Schleuning, R. Hell, H. Schiessler und H. Fritz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1915-1921 (1975)
- 145) H.U. Bergmeyer, E. Bernt, K. Gawehn und G. Michal, in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer ed.) 184-185 Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1974

## LEBENS LAUF

Harbaum-Neuhaus, Giso, Günther

31.10.1949 Geboren in Friedensdorf, Kreis Biedenkopf, als  
drittes von fünf Kindern der Eheleute Dr. med.  
Günther Neuhaus und Dr. med. Ursula Neuhaus, geb.  
Brandt

27.03.1956 - Volksschule Friedensorf

25.03.1960

01.04.1960 - Gymnasium, Lahntalschule Biedenkopf

30.05.1968

05.06.1968 Abitur

01.08.1968 - Praktikant in der Adlerapotheke in Bad Schwalbach

31.07.1970 bei Herrn Apotheker R. Kocher

23.06.1970 Pharmazeutisches Vorexamen

01.10.1970 - Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander

31.03.1975 Universität in Erlangen

16.05.1975 Pharmazeutische Prüfung

01.07.1975 Approbation als Apotheker

01.06.1975 - Angestellt in der Lerchenapotheke in Kreuztal

30.11.1975 bei Frau Apothekerin G. Leuthold

01.12.1975 - Wissenschaftliche Hilfskraft und Doktorand bei

31.03.1976 Prof. Dr. O. Dann, Institut für Pharmazie und Le-  
bensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürn-  
berg

Seit Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaft-  
01.04.1976 lichen Assistenten

28.06.1966 Adoption durch Frau Apothekerin I. Harbaum

24.01.1975 Eheschließung mit Sybille Kügler aus Bad  
Schwalbach

17.08.1975 Geburt des Sohnes Jens

05.11.1976 Geburt des Sohnes Jochen

30.12.1977 Geburt des Sohnes Axel.







**Offset —**  
**Siebdruck**  
**S.Kriegelstein**



**Bierlachweg 37 8520 Erlangen**  
**Telefon 09131/33907**